

Expressão de Prolactina, c-fos e TGF β
no Endométrio Humano: Influência do Ciclo Menstrual
e Efeitos do Acetato de Medroxiprogesterona

INFORMAÇÕES PARA CATÁLOGO

Reis, Fernando Marcos dos

Expressão de Prolactina, c-fos e TGF β no Endométrio Humano: Influência do Ciclo Menstrual e Efeitos do Acetato de Medroxiprogesterona / Fernando Marcos dos Reis. Porto Alegre, 1998.

110 p.

Tese (Doutorado). Clínica Médica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

1. Endométrio
4. TGF β
6. Progestogênio

2. Prolactina
5. Ciclo menstrual

3. c-fos

I. Título

Fernando Marcos dos Reis

Expressão de Prolactina, c-fos e TGF β
no Endométrio Humano: Influência do Ciclo Menstrual
e Efeitos do Acetato de Medroxiprogesterona

Tese apresentada à Universidade Federal
do Rio Grande do Sul como requisito
parcial para a obtenção do grau de Doutor
em Medicina: Clínica Médica.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientadora: Prof. Dra. Poli Mara Spritzer

Coorientadora: Prof. Dra. Ana Luiza Maia



Porto Alegre
1998





Gustav Klimt (1862–1918)

"Dama com leque" – 1917

Dedico este trabalho

às 46 mulheres que participaram como voluntárias;

às 15 mulheres que contribuíram profissionalmente para sua realização;

à mulher da minha vida: Andréa

Scientists, read poetry. Poets, read science. In science, poets will gain the world and keep their souls; in poetry, scientists can gain entry to imaginary gardens for their real toads.

(John Timpane, 1991)

*Ho contemplato dalla luna, o quasi
il modesto pianeta che contiene
filosofia, teologia, politica,
pornografia, letteratura, scienze
palesi o arcane. Dentro c'è anche l'uomo,
ed io tra questi. E tutto è molto strano.*

(Eugenio Montale, 1968)

ORIENTADORA:

Prof. Dra. Poli Mara Spritzer

Professora Titular do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Coordenadora da Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

COORIENTADORA:

Prof. Dra. Ana Luiza S. Maia

Professora Adjunta do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

COLABORAÇÃO CIENTÍFICA:

Prof. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro

Professora Adjunta do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

APOIO TÉCNICO:

Iracema Vera Soares

Maria da Glória Souza Gomes

Elizabeth Pinheiro da Silva

APOIO FINANCEIRO:

\$ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
(processo nº 141880/95-3)

\$ Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – FIPE-
HCPA (processo nº 970054)

\$ Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP (Convênio nº 41960949.00)

\$ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS
(processo nº 96/1765.7)

❖ Meus pais, que amenizaram o drama de depender da bolsa do CNPq.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço a valiosa colaboração das seguintes pessoas:

- ✓ Prof. Dra. Lígia Maria Barbosa Coutinho, que gentilmente abriu o espaço e a infra-estrutura do seu laboratório na Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA), permitindo-me padronizar e executar parte das colorações por imuno-histoquímica. A Prof. Lígia também me garantiu acesso ao departamento de Patologia da FFFCMPA para a realização dos cortes histológicos e me ensinou a utilizar o fotomicroscópio.
- ✓ Teresinha Stein e Cristina de Moura, cujo apoio técnico altamente qualificado foi fundamental para as preparações histológicas.
- ✓ Prof. Dra. Matilde E. Achaval, que gentilmente abriu espaço na sua agenda para me auxiliar a concluir a documentação fotográfica.
- ✓ Francisco Lhullier, bioquímico responsável pelo laboratório de hormônios do HCPA, que supervisionou pessoalmente as dosagens hormonais.
- ✓ Prof. Dr. Ellis A. D'Arrigo Busnello (coordenador) e todos os funcionários do Curso de Pós-Graduação em Medicina – Clínica Médica da UFRGS, que me deram apoio e incentivo ao longo desses três anos.
- ✓ Professores e Funcionários do Departamento de Fisiologia e do Curso de Pós-Graduação em Ciências – Fisiologia da UFRGS, que me proporcionaram um ambiente de cortesia, amizade e profissionalismo.
- ✓ Professores Maria Inês Schmidt e Bruce Duncan (Epidemiologia Clínica), Sídia C. Jacques (Bioestatística) e Cláudio Moreno (Português), que me abriram novos horizontes e multiplicaram minha paixão pela pesquisa científica.
- ✓ Direção e funcionários do Hospital Escola Materno-Infantil Presidente Vargas, que foram muito receptivos e deram apoio e sugestões ao meu trabalho.
- ✓ Drs. Maria José A. Rocha e Hérica C. Mendonça (USP–Ribeirão Preto) e Rui Luzatto (Instituto de Patologia), que me cederam bibliografia especializada.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Sou profundamente grato à Prof. Dra. Poli Mara Spritzer, que aceitou o risco de me orientar quando mal nos conhecíamos e que me ensinou lições de ciência, conduta profissional, liderança e humanismo. Sou grato também à Prof. Ana Luiza Maia pela paciência inesgotável com que me transmitiu os fundamentos da biologia molecular, e à Prof. Maria Flávia M. Ribeiro pelas idéias originais, comentários bem humorados e apoio moral quando parecia que o trabalho estava perdido. Agradeço a imensa colaboração e amizade dos colegas do laboratório, especialmente da Prof. Ilma Simoni Brum da Silva, cuja administração dos recursos materiais e financeiros foi o alicerce deste trabalho – ao mesmo tempo fundamental e invisível. Sou grato também aos colegas da Unidade de Endocrinologia Ginecológica pelo grande carinho e amizade e, especialmente, ao Dr. Luiz Cezar Vilodre, que me abriu a possibilidade de recrutar as pacientes no Hospital Presidente Vargas. Finalmente, agradeço aos queridos amigos Drs. José Heliodoro Xavier de Castro e Vera D. Borges de Castro pela amável acolhida em sua casa nos primeiros tempos de Porto Alegre, e a toda a minha família pelas mais variadas e profundas razões.

A todos, muito obrigado.

Sumário

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
TRABALHOS ESCRITOS COM OS DADOS DESTA TESE	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
1. INTRODUÇÃO	1
ENDOMÉTRIO	3
<i>Morfologia</i>	3
<i>Alterações estruturais cíclicas</i>	3
<i>Alterações estruturais durante a gravidez: decidualização e implantação</i>	5
<i>Alterações funcionais cíclicas</i>	6
<i>Produtos secretados pelo endométrio e decídua</i>	8
<i>Prolactina endometrial</i>	10
ESTERÓIDES OVARIANOS	13
<i>Estrogênios</i>	13
<i>Efeitos do estradiol sobre a proliferação celular</i>	14
<i>Progesterona</i>	16
<i>Efeitos da progesterona sobre a proliferação e diferenciação de tecidos alvo</i>	17
<i>Progestogênios</i>	19
FATORES DE CRESCIMENTO E PROTOONCOGENES	21
<i>Insulina, IGF-I, IGF-II e IGFs</i>	21
<i>EGF e TGF-α</i>	22
<i>Outros Fatores de Crescimento (PDGF, FGF)</i>	24
<i>Fator de Crescimento "Transformante" beta (TGFβ)</i>	24
<i>Protooncogenes (c-fos, c-myc, c-ras, c-jun)</i>	27
OBJETIVOS	28
<i>Objetivo geral</i>	28
<i>Objetivos específicos</i>	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
<i>Modalidade de estudo</i>	30
<i>Fatores em estudo</i>	30
<i>Principais Desfechos</i>	30
CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	31
PACIENTES	31
<i>Critérios de Inclusão e Exclusão</i>	31
<i>Randomização</i>	32
<i>Tratamento</i>	33
<i>Coleta de Sangue e Preparo das Amostras</i>	33
<i>Biópsia de Endométrio</i>	34
HISTOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA	34
<i>Preparo das lâminas</i>	34
<i>Inclusão e Corte</i>	35
<i>Datação das Biópsias Endometriais</i>	35
<i>Técnica da Avidina-Biotina-Peroxidase</i>	37
<i>Coloração para PRL</i>	41
<i>Coloração para c-fos</i>	43
<i>Coloração para TGFβ1</i>	43
<i>Coloração para TGFβ3</i>	44
<i>Leitura das Lâminas</i>	44
<i>Análise Estatística</i>	44

DOSAGENS HORMONAIS	45
<i>Técnica da Quimioluminescência Automatizada</i>	45
<i>Protocolo das Dosagens</i>	47
<i>Análise Estatística</i>	47
AValiação DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR	48
<i>Extração e Quantificação do RNA</i>	48
<i>Síntese do cDNA</i>	49
<i>Oligonucleotídeos Específicos</i>	49
<i>Protocolo Geral da PCR</i>	50
<i>Programação dos Ciclos de PCR</i>	52
<i>Padronização da PCR para PRL</i>	53
<i>Padronização da PCR para c-fos</i>	54
<i>Padronização da PCR para TGFβ1</i>	56
<i>Padronização da PCR para TGFβ2 (dados preliminares)</i>	56
<i>Padronização da PCR para TGFβ3</i>	58
<i>Padronização da PCR para β₂-Microglobulina</i>	60
<i>Controles de Sensibilidade e Especificidade</i>	62
<i>Visualização e Quantificação dos Produtos de PCR</i>	63
<i>Análise Estatística</i>	64
3. RESULTADOS	65
CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AMOSTRA	65
<i>Confirmação do uso correto do MPA</i>	66
NÍVEIS SÉRICOS DE ESTRADIOL, PROGESTERONA E PROLACTINA	69
PROLACTINA ENDOMETRIAL	69
<i>PRL Imunorreativa</i>	69
<i>mRNA da PRL no endométrio</i>	73
C-FOS	74
<i>Proteína fos Imunorreativa</i>	74
<i>mRNA do c-fos no endométrio</i>	74
FATOR DE CRESCIMENTO TGFβ1	81
<i>TGFβ1 imunorreativo</i>	81
<i>mRNA do TGFβ1 no endométrio</i>	81
FATOR DE CRESCIMENTO TGFβ2 (DADOS PRELIMINARES)	81
<i>mRNA do TGFβ2 no endométrio</i>	81
FATOR DE CRESCIMENTO TGFβ3	86
<i>TGFβ3 imunorreativo</i>	86
<i>mRNA do TGFβ3 no endométrio</i>	86
β ₂ -MICROGLOBULINA	91
<i>mRNA da β₂-microglobulina no endométrio</i>	91
4. DISCUSSÃO	92
<i>Características gerais da amostra estudada</i>	94
<i>Aspectos Metodológicos</i>	94
<i>Prolactina Endometrial</i>	97
<i>c-fos</i>	99
<i>TGFβ</i>	100
<i>Controle integrado do ciclo endometrial</i>	102
CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
ANEXOS	116

Resumo

O mecanismo de ação dos esteróides sexuais sobre a proliferação e diferenciação do endométrio envolve a participação de fatores de crescimento e protooncogenes, cuja regulação é pouco conhecida. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência do ciclo menstrual e os efeitos do acetado de medroxiprogesterona (MPA) sobre a expressão de prolactina (PRL), do protooncogene *c-fos* e do fator de crescimento TGF β no endométrio humano *in vivo*. Quarenta e seis mulheres com ciclos regulares receberam, de forma randomizada, placebo ou MPA (10mg/dia, 10 dias). Em seguida foram submetidas a biópsia do endométrio e as amostras foram classificadas em 3 grupos de acordo com a fase do ciclo/tratamento: Proliferativo/Placebo (grupo 1, N=11), Secretor/Placebo (grupo 2, N=18) e Secretor/MPA (grupo 3, N=8). Parte do material foi fixada em formol e incluída em parafina, sendo posteriormente submetida a coloração por imuno-histoquímica. O restante foi congelado a -70°C para posterior análise do RNA mensageiro (mRNA) pela técnica de RT-PCR. Encontrou-se PRL imunorreativa no epitélio glandular de 9,1% das amostras do grupo 1, em 55,6% das amostras do grupo 2 e em 100% das amostras do grupo 3 ($p<0,05$; teste de Fisher). No estroma endometrial, observou-se imunocoloração para PRL em 9,1% , 66,7% e 87,5% das biópsias dos grupos 1, 2 e 3, respectivamente ($p<0,01$). Os níveis médios de mRNA da PRL foram maiores na fase secretora (grupo 2) e significativamente maiores no grupo 3 em relação ao grupo 1 ($p<0,05$). Observou-se imunocoloração para *c-fos* (predominando no núcleo das células estromais) em 54,5% das biópsias do grupo 1, em 7,1% das do grupo 2 e em nenhuma do grupo 3 ($p<0,05$, grupo 1 *vs* 2 e 3). Os níveis de mRNA do *c-fos* foram substancialmente menores nos grupos 2 e 3 comparados ao grupo 1 ($p<0,05$) e apresentaram correlação direta com os níveis séricos de estradiol ($r= 0,56$; $p<0,02$). Não houve diferença entre os grupos quanto à expressão de TGF β 1. Entretanto, a frequência de amostras com imunocoloração positiva para TGF β 3 e os níveis de mRNA do TGF β 3 foram sucessivamente maiores nos grupos 2 e 3 em comparação com o grupo 1. Os dados demonstram aumento da expressão de PRL e TGF β 3 e inibição da expressão de *c-fos* no endométrio durante a fase secretora do ciclo menstrual, bem como no endométrio estimulado por MPA. A inibição de *c-fos* e o aumento na expressão de TGF β 3 poderiam participar do mecanismo antiproliferativo da progesterona e dos progestogênios sobre o endométrio humano *in vivo*.

Abstract

Growth factors and protooncogenes are involved in the mechanism of sex steroid-stimulated growth and differentiation of the endometrium, but their precise regulation remains unclear. The aim of the present study was to evaluate the influence of menstrual cycle and the effects of medroxyprogesterone acetate (MPA) on the expression of prolactin (PRL), *c-fos* and transforming growth factor beta (TGF β) in the human endometrium *in vivo*. Forty-six cycling women were randomized to receive either 10 mg MPA or placebo, once a day during 10 days. Endometrial specimens were obtained about 8–12 hours following the last tablet intake and patients were classified into three groups according to biopsy dating and treatment: Proliferative/Placebo (group 1, N=11), Secretory/Placebo (group 2, N=18) and Secretory/MPA (group 3, N=8). Endometrial samples were partially snap-frozen in liquid nitrogen and partially fixed in formalin, embedded in paraffin and stained by immunohistochemistry. Messenger ribonucleic acid (mRNA) levels were assessed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Immunoreactive PRL was found in the epithelium of 9.1% of the specimens from group 1, in 55.6% of group 2, and in 100% of group 3 ($p<0.05$, Fisher's exact test). In the endometrial stroma, immunopositive PRL was present in 9.1%, 66.7% and 87.5% of the specimens from groups 1, 2 and 3, respectively ($p<0.01$). The average levels of PRL mRNA were slightly increased in group 2 and markedly increased in group 3 compared to group 1 ($p<0.05$). Immunoreactive *c-fos* was concentrated in the nucleus of stromal cells in 54.5% of the biopsies from group 1, in 7.1% of group 2, and in 0% of group 3 ($p<0.05$, group 1 *vs* 2 and 3). The levels of *c-fos* mRNA were greatly reduced in groups 2 and 3 compared to group 1 ($p<0.05$) and correlated positively with serum estradiol levels ($r=0.56$, $p<0.02$). There were no differences between groups concerning to the endometrial expression of TGF β 1. However, the frequency of immunopositive samples for TGF β 3 and the levels of TGF β 3 mRNA were higher in groups 2 and 3 compared to group 1. It is concluded that MPA induces PRL and TGF β 3 and inhibits *c-fos* expression in endometrial cells *in vivo*, resembling what occurs during the secretory phase of spontaneous ovulatory cycles. The inhibition of *c-fos* and the increase of TGF β 3 expression may contribute to the antiproliferative effect of progestins on the endometrium.

Trabalhos escritos com os dados desta tese

1. REIS FM, RIBEIRO MFM & SPRITZER PM (1998) Effects of medroxyprogesterone on endometrial prolactin and c-*fos* protein in cycling women: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gynecological Endocrinology* 12 (suppl. 2): FC100.
2. REIS FM, RIBEIRO MFM & SPRITZER PM (1998) Regional localization of immunoreactive c-*fos* and prolactin in human endometrium during the normal menstrual cycle. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 45: in press.
3. REIS FM, MAIA AL, RIBEIRO MFM & SPRITZER : Sex steroid modulation of c-*fos* and prolactin immunostaining and messenger ribonucleic acid in human endometrium. *Submetido para publicação*.
4. REIS FM, MAIA AL, RIBEIRO MFM & SPRITZER: Effects of menstrual cycle and progestin on the expression of transforming growth factor beta in human endometrium. *Manuscrito em preparação*.

Lista de Abreviaturas

A	adenosina
C	citossina
cAMP	monofosfato de adenosina cíclico
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CRH	hormônio liberador de corticotrofina
CSF	fator estimulador de colônias
DAB	3,3'-diaminobenzidina
EDTA	tetra-acetato de etilenodiamina
EGF	fator de crescimento epidérmico
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
FSH	hormônio folículo-estimulante
G	guanidina
hCG	gonadotrofina coriônica humana
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	proteína ligadora de fator de crescimento semelhante à insulina
IL	interleucina
IOD	densidade ótica integrada
IRAP	peptídeo antagonista do receptor de interleucina
LH	hormônio luteinizante
LT	leucotrieno
MPA	acetato de medroxiprogesterona
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
PCR	reação em cadeia de polimerase
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PG	prostaglandina
PRL	prolactina
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa
SHBG	globulina ligadora de hormônios sexuais
T	timidina
TBG	proteína ligadora de hormônio tireoidiano
TGF	transforming growth factor
TNF	fator de necrose tumoral

Introdução

O conceito original de Endocrinologia (estudo das secreções internas) ficou muito restrito para abrigar os enormes avanços que a fisiologia hormonal experimentou durante o século XX. Substâncias com todas as características que definem um hormônio são produzidas fora das glândulas endócrinas clássicas e nos forçam a substituir o conceito de glândula endócrina pelo de tecido endócrino (caso dos rins, pulmões, trato gastrointestinal) ou neuroendócrino. Já os hormônios clássicos, como insulina, hormônio tireoidiano e esteróides gonadais, não se limitam aos efeitos endócrinos (ação à distância, via circulação sangüínea) mas revelam-se também agentes parácrinos e autócrinos.

Neste novo cenário, avança rapidamente o estudo funcional de produtos secretados pelo endométrio, seja durante o ciclo menstrual, seja no decorrer da gestação, quando ele adquire funções especiais e recebe o nome de decídua. Esses produtos exercem seu papel mais importante no próprio útero e na unidade feto-placentária, aonde chegam por difusão. O interesse dos pesquisadores pelos mecanismos de síntese e secreção de proteínas reguladoras no endométrio se justifica porque, à luz dos conhecimentos atuais, estas substâncias se tornaram peça chave para a elucidação de inúmeros processos fisiológicos e patológicos relacionados à função endometrial, como, por exemplo, sangramento uterino anormal, abortamentos de repetição, distúrbios de implantação embrionária, endometriose, hiperplasias e neoplasias. Como a decídua interage intimamente com a placenta, o estudo das secreções produzidas pelo endométrio em processo de decidualização pode revelar a síntese de substâncias importantes para a gravidez normal e patológica.

O endométrio é alvo da ação de hormônios sexuais e sofre transformações morfológicas e funcionais em decorrência da liberação cíclica desses hormônios.

Estrogênio e progesterona atuam por mecanismos complexos, principalmente induzindo a síntese de algumas proteínas e inibindo a síntese de outras. Algumas dessas proteínas atuam como mediadoras da ação dos esteróides sobre o próprio endométrio e os tecidos vizinhos. O cenário complexo da interação entre os esteróides e as proteínas endometriais tem sido objeto de exaustiva investigação nas últimas décadas, orientada pelas seguintes perguntas:

- 1) A proteína X está presente no endométrio?
- 2) Ela é sintetizada pelo próprio endométrio ou apenas captada?
- 3) A concentração da proteína X varia durante o ciclo menstrual?
- 4) A concentração da proteína X é modificada pela administração de esteróides sexuais ou fármacos (*in vivo* ou *in vitro*)?
- 5) A concentração da proteína X está alterada no endométrio patológico?
- 6) Que outros fatores endócrinos, parácrinos ou autócrinos regulam a síntese da proteína X no endométrio?
- 7) Que outros fatores endócrinos, parácrinos ou autócrinos têm sua síntese regulada pela proteína X no endométrio?
- 8) Qual o efeito da proteína X sobre a proliferação celular e a diferenciação do endométrio?
- 9) Qual o papel da proteína X na etiopatogenia das doenças endometriais?

Neste trabalho escolhemos quatro proteínas (prolactina, *c-fos*, TGF β 1 e TGF β 3) cuja síntese já havia sido demonstrada no endométrio humano, mas sobre as quais a maioria das questões acima permanece em aberto. Nossa investigação se concentrou nas quatro perguntas iniciais, que poderiam ser abordadas num único modelo experimental. O enfoque principal recaiu sobre os efeitos moleculares do acetato de medroxiprogesterona, um progestogênio derivado da progesterona, utilizado no tratamento do sangramento uterino disfuncional, endometriose, carcinoma de endométrio, além da terapia de reposição hormonal e da contracepção. Este modelo experimental permitiu extrair conclusões não apenas sobre o provável papel fisiológico da progesterona natural, mas também sobre a farmacologia do progestogênio testado.

Endométrio

Morfologia

O sistema reprodutor feminino se desenvolve a partir dos ductos paramesonéfricos (de Müller) que se fundem por volta da décima semana de gestação, dando origem ao útero, tubas uterinas e porção superior da vagina. Esses ductos são a princípio revestidos por um epitélio cuboidal simples que, mais adiante, adquire a forma colunar e pseudoestratificada. Logo abaixo do epitélio existe uma camada de mesênquima que dará origem ao estroma endometrial e à musculatura lisa do útero. A diferenciação embrionária do endométrio se completa por volta da vigésima semana de gestação, quando ele passa a ser estimulado pelos estrogênios placentários e chega a desenvolver algumas glândulas, inclusive com atividade secretora. Após o nascimento, as estruturas endometriais regridem e permanecem atroficas até a próxima estimulação estrogênica, por ocasião da puberdade¹⁴⁵.

O endométrio é constituído por um epitélio de revestimento, um estroma conjuntivo com glândulas tubulares que se abrem na superfície e uma membrana de colágeno e proteoglicanas que reveste a base das células epiteliais. Os diversos tipos celulares que constituem o endométrio têm seu ciclo de proliferação e diferenciação regulado de maneira distinta. O epitélio de revestimento, por exemplo, possui células ciliadas cuja proporção aumenta sob estímulo estrogênico³⁹, enquanto o epitélio glandular responde aos estrogênios aumentando o número de mitoses e passando do formato cúbico ao colunar. As células estromais, que são fusiformes e proliferam sob estímulo estrogênico no início do ciclo menstrual, tornam-se arredondadas e secretam novos produtos quando estimuladas pela progesterona.

Alterações estruturais cíclicas

No início da fase proliferativa, contada a partir do primeiro dia de fluxo menstrual, o endométrio tem uma espessura inferior a 2 mm e a camada superfi-

cial começa a ser regenerada a partir das células basais, que não sofrem descamação. Nesta fase, o endométrio se caracteriza por glândulas retilíneas, de pequeno diâmetro, com epitélio colunar baixo e núcleos redondos situados na base das células epiteliais. São observadas figuras de mitose tanto no estroma quanto no epitélio glandular. As células estromais profundas são mais agregadas e possuem núcleos menores que os das células localizadas na parte mais superficial do estroma.

Na fase proliferativa intermediária aumentam as mitoses estromais, as glândulas tornam-se mais largas e abundantes e surge um discreto edema estromal. O epitélio luminal e glandular torna-se mais alto, com aparência nitidamente colunar, e o crescimento glandular produz pseudoestratificação dos núcleos, uma ilusão de óptica resultante da tortuosidade das glândulas em proliferação. A fase proliferativa termina com uma redução nas mitoses estromais e regressão do edema, enquanto a pseudoestratificação nuclear chega ao ponto máximo¹¹².

A primeira alteração morfológica que caracteriza a fase secretora do ciclo endometrial é o aparecimento de vacúolos basais no epitélio glandular. Este sinal pode ser observado nas primeiras 48 horas após a ovulação, e decorre do aumento nos níveis circulantes de progesterona. Com a continuidade do estímulo progestínico, as células epiteliais aumentam sua atividade secretora e o produto da secreção torna-se histologicamente visível na luz glandular. Reaparece o edema estromal, porém agora mais estável e intenso que o da fase proliferativa. O início da fase secretora permite identificar uma zona compacta, mais superficial, rica em estroma e com glândulas mais estreitas e retas, seguida pela zona esponjosa, de aspecto reticulado, pouco estroma e glândulas tortuosas. Abaixo dessas duas camadas – também chamadas de endométrio *funcional* em virtude das transformações cíclicas que sofrem – encontra-se a zona basal, contígua ao miométrio e responsável pela regeneração das camadas suprajacentes.

A fase secretora intermediária caracteriza-se pelo auge do edema estromal, que contribui para uma redução gradativa na espessura do endométrio.

Aumenta a vascularização e as arteríolas espiraladas podem ser vistas no corte histológico. As glândulas são tortuosas, chegam ao máximo da atividade secretora e restam-lhes poucos vacúolos basais. As células estromais próximas aos vasos sangüíneos tornam-se maiores, passam de fusiformes a arredondadas, ganham um citoplasma eosinofílico e uma matriz pericelular. Esse conjunto de transformações é denominado *reação pré-decidual*.

A principal característica do endométrio secretor tardio é a infiltração de leucócitos. As glândulas mostram sinais de redução da atividade secretora e o estroma se torna mais frouxo, em processo de desintegração. A espessura do endométrio diminui e o edema regride. Na fase perimenstrual ocorre vasoconstrição arteriolar e isquemia nas camadas superficiais, seguida por enfraquecimento das paredes vasculares, hemorragia intratecidual, distensão por acúmulo de sangue, formação de fissuras, descamação de fragmentos e reabsorção tecidual por macrófagos¹⁴⁵.

Alterações estruturais durante a gravidez: decidualização e implantação

A decídua humana é um tecido especializado derivado do endométrio, que começa a se diferenciar durante a fase lútea do ciclo menstrual, preparando o ambiente para implantação do blastocisto⁹. Logo, a decídua também pode ser definida como “o endométrio da gestação”¹¹⁸ e o termo célula decidual se aplica à célula estromal típica da decídua. Sob influência da progesterona, sinais histológicos de decidualização (reação pré-decidual) podem ser reconhecidos por volta do 8º ao 10º dia após a ovulação¹¹². Se ocorre gravidez, as células deciduais proliferam e continuam a passar por transformações morfológicas e funcionais. Apesar de um grande número de estudos apontando as características bioquímicas e estruturais da célula decidual, a seqüência exata dos eventos moleculares que caracterizam a diferenciação da decídua permanece desconhecida³⁷.

A decidualização do endométrio humano se completa por volta do quinto dia após a implantação do blastocisto⁶⁴. Uma perfeita sincronia entre o desenvolvimento do embrião e a decidualização do endométrio é requisito

indispensável para a implantação embrionária normal. A experiência acumulada com o advento das técnicas de fertilização assistida tem revelado que na espécie humana a “janela” de implantação, período no qual o endométrio é receptivo ao blastocisto, tem duração aproximada de três dias e corresponde ao 16º–19º dias do ciclo induzido artificialmente¹⁰⁶. A análise ultraestrutural do epitélio luminal do útero humano na época da implantação revela a proeminência de células ovóides, com microvilosidades espessas e a superfície celular coberta por gotículas. Por volta do sexto dia após a ovulação, os microvilos e as gotículas dão lugar a protusões apicais chamadas “pinópodos”, que por sua vez desaparecem na altura do nono dia, deixando o epitélio com aspecto poligonal e revestido por microvilosidades finas¹⁴⁵.

A decídua continua a se desenvolver ao longo da gravidez, adquirindo uma configuração de mosaico com limites celulares bem definidos, graças ao acúmulo pericelular de matriz rica em laminina. Os produtos de secreção da decídua são lançados no sangue e no líquido amniótico a partir do segundo trimestre da gestação. Próximo do termo, as glândulas deciduais começam a atrofiar e escassear¹⁴⁵.

Alterações funcionais cíclicas

O endométrio passa por alterações cíclicas da concentração de receptores hormonais, da atividade de enzimas esteroideogênicas e proteolíticas, assim como da secreção de eicosanóides, mucinas, proteínas carreadoras, citocinas e prolactina (PRL). O endométrio também é local de síntese e alvo da ação de fatores de crescimento e protooncogenes, que têm sua expressão modulada por esteróides sexuais durante o ciclo menstrual, como se verá mais adiante.

Os receptores estrogênicos aumentam durante a fase folicular e diminuem após a ovulação, refletindo o efeito supressor da progesterona^{47,162}. Já os receptores de progesterona têm sua síntese estimulada pelo estradiol e atingem a concentração máxima durante o período periovulatório, quando predominam no núcleo das células epiteliais¹⁴⁵. Durante a fase secretora, a progesterona inibe a

síntese do seu receptor em todo o endométrio, com exceção das células estromais decidualizadas¹²². Esta particularidade parece estar relacionada a alterações enzimáticas próprias da decidualização, que resultam no aumento da disponibilidade intracelular de estradiol¹⁰.

A atividade de enzimas que modulam a concentração intratissular de estradiol varia consideravelmente durante o ciclo menstrual. O estradiol captado do meio extracelular pode ser convertido em estrona pela 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase, ou em derivados sulfatados pela sulfotransferase. Essas reações de inativação do estradiol são estimuladas pela progesterona, sendo portanto mais proeminentes na fase lútea do ciclo menstrual¹⁴⁵. No sentido oposto, sulfato de estrona (o estrogênio mais abundante na circulação) é captado pelas células endometriais e convertido pela sulfatase em estrona livre, que por sua vez é convertida em estradiol pela enzima 17 β -hidroxiesteróide oxirredutase (17 β HOR). Essas reações que convertem estrogênio inativo em estradiol são particularmente intensas nas células estromais decidualizadas, devido ao aumento na atividade de sulfatase¹⁰. Diferenças na concentração local de estradiol entre os diversos tipos celulares do endométrio explicam a resposta aparentemente paradoxal de algumas células às flutuações dos níveis de estradiol na circulação.

Os mecanismos celulares e moleculares que conduzem à desintegração do endométrio e à menstruação ainda são desconhecidos, apesar da seqüência de eventos histológicos estar bem caracterizada. A participação de enzimas proteolíticas lisossomais⁶³ e de serinoproteinases ativadoras do plasminogênio⁸⁷ foi sugerida há quase 30 anos com a demonstração de que essas enzimas têm sua atividade aumentada no endométrio menstrual, mas estudos posteriores não comprovaram relação causal entre o aumento das enzimas e o início da menstruação. Recentemente, surgiram evidências da participação de metaloproteinases no processo de desintegração da matriz extracelular do endométrio menstrual. Estudos *in vitro* mostraram que a progesterona inibe a síntese das metaloproteinases estromelisina-1¹³⁶ e matrilisina¹⁵ por células endometriais em cultura, sugerindo que a queda nos níveis de progesterona na fase lútea tardia poderia

favorecer a atividade dessas enzimas proteolíticas.

Produtos secretados pelo endométrio e decídua

A secreção de prostaglandinas (PG) pelas células do epitélio endometrial *in vitro* é estimulada por estrogênio e inibida por progesterona. Entretanto, dosagens de PGE₂ e PGF_{2α} no lavado ou no sangue venoso uterino indicam que as maiores concentrações correspondem à fase secretora tardia¹⁴⁵. É possível que isso reflita não o estímulo progestogênico da fase secretora mas exatamente a redução pré-menstrual da secreção de progesterona pelo corpo lúteo. Outra hipótese é que a secreção endometrial de PG seja simultaneamente regulada por citocinas e hormônios peptídicos, como o hormônio liberador de corticotrofina (CRH)^{32,117}. A incubação de células endometriais com endotelina-1 também resulta na liberação de PGF_{2α} em função de maior atividade das enzimas fosfolipase A2 e fosfolipase C¹. Além das PG, que derivam do ácido araquidônico pela via da ciclo-oxigenase, o endométrio sintetiza ácidos hidroxieicosatetranoicos (HETE) e leucotrienos (LT) pela via da lipoxigenase¹⁴⁵. A função desses eicosanóides no ciclo menstrual não está bem estabelecida, mas sua secreção pela decídua parece estar relacionada ao início do trabalho de parto¹⁶⁷.

As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular que contêm mucopolissacarídeos ácidos e são secretadas pelas glândulas endometriais durante a fase lútea intermediária. O epitélio luminal produz uma proteína ligadora que capta imunoglobulina A da circulação e a transporta através da célula epitelial até sua borda apical, liberando IgA na cavidade uterina. Essa proteína tem sua síntese aumentada sob ação da progesterona¹⁴⁵. A proteína endometrial associada à progesterona (PEP) é uma glicoproteína dimerizada produzida principalmente no epitélio glandular, mas também nas células deciduais⁷⁷. Inicialmente isolada da placenta e chamada de proteína placentária 14 (PP-14), a PEP pode estar envolvida no fenômeno da tolerância imunológica da gravidez, pois tem efeito imunossupressor¹⁴⁵. O endométrio também secreta α_2 -

macroglobulina, uma glicoproteína inibidora de proteases, que predomina no estroma da camada compacta durante a fase secretora do ciclo menstrual¹³⁵.

Proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs) também são produzidas no endométrio e modulam a biodisponibilidade local dos fatores de crescimento IGF-I e IGF-II, exercendo assim efeito antiproliferativo indireto⁴⁴. A síntese de IGFBP-1 é particularmente detectada em células estromais decidualizadas, sendo estimulada pela progesterona e inibida pela insulina^{51,161}. Dispositivos intra-uterinos (DIU) medicados com levonorgestrel estimulam a secreção endometrial de IGFBP-1, efeito este não obtido com DIU de cobre nem com progestogênio de depósito subcutâneo¹¹⁶. A secreção de IGFBP-1 pela decídua é regulada de forma complexa e parece influir no processo de implantação embrionária e no controle da invasão trofoblástica³⁷.

Citocinas são peptídeos ou glicoproteínas que exercem efeito regulador sobre uma grande variedade de tecidos, inclusive sobre o sistema hematopoiético¹³⁸. O endométrio humano é local de intensa produção de citocinas, e é também sítio de ação de um grande número delas¹⁴⁹. Dentre as citocinas identificadas no endométrio incluem-se fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucinas (IL)-1 α , 1 β e 6, peptídeo antagonista do receptor de interleucina (IRAP) e fator estimulador de colônias (CSF)-1. No início do ciclo, a concentração de mRNA do TNF- α predomina no epitélio glandular, mas na fase proliferativa intermediária encontra-se sinal de hibridização do mesmo mRNA também nas células estromais⁷¹. A expressão citoplasmática difusa de IL-1 α e IL-6 durante a fase proliferativa contrasta acentuadamente com a expressão luminal que se observa durante a fase secretora do ciclo menstrual¹⁵⁰. A distribuição abundante de citocinas no endométrio humano ao longo de todo o ciclo menstrual sugere que vários aspectos funcionais do endométrio, como crescimento, síntese proteica e decidualização podem ser modulados por citocinas¹⁵⁰.

Prolactina endometrial

O produto de secreção que melhor identifica o endométrio em processo de decidualização é a PRL. Estudos feitos com imuno-histoquímica^{82,173} ou hibridização *in situ*^{151,152} revelaram a presença de PRL e do seu mRNA especificamente na célula estromal decidualizada. Experimentos com células estromais mantidas em cultura mostraram que a síntese e a secreção de PRL se correlacionam diretamente com as transformações morfológicas características da decidualização^{148,172}. Já as células do epitélio glandular não secretam PRL no meio de cultura mesmo após estímulo hormonal prolongado¹²⁴.

A PRL decidual é idêntica à hipofisária na sua estrutura, propriedades imunogênicas e atividade biológica¹⁵⁹, porém é regulada por mecanismos diferentes e independentes daqueles que regulam a secreção de PRL pela hipófise. Por exemplo, ao contrário do que se passa na hipófise, a secreção de PRL endometrial não é estimulada por estradiol^{70,74} ou hormônio liberador de tireotrofina (TRH)⁵³ nem é inibida por dopamina ou bromocriptina⁵³. O mRNA da PRL transcrito no endométrio e decídua possui uma seqüência não-traduzida de tamanho variável na extremidade 5', inexistente no mRNA transcrito pela hipófise³³. Essa diferença indica que a regulação gênica e o sítio de início da transcrição da PRL variam de um tecido para outro⁶⁵. A célula decidual não armazena PRL em grânulos de secreção, como é usual para os hormônios protéicos, mas libera a PRL logo após a síntese, num processo que independe do cálcio extracelular⁹⁶.

Durante a fase secretora do ciclo menstrual, a presença contínua de níveis mais elevados de progesterona na circulação induz a secreção de PRL endometrial^{82,99}. A progesterona (ou um progestogênio) também é indispensável para que ocorra secreção de PRL por células estromais cultivadas^{28,70}. Seu estímulo é proporcional à dose e tem efeito cumulativo ao longo do tempo¹²⁴. O efeito da progesterona sobre a secreção de PRL parece ser uma consequência da diferenciação celular e não um efeito direto do esteróide sobre a transcrição gênica da

PRL. Isso porque, à medida que se diferenciam e secretam mais PRL, as células decíduais possuem menos receptores de progesterona e estão, portanto, menos expostas ao estímulo progestogênico subsequente¹⁶⁸. Outra evidência indireta é a demonstração de que a região reguladora do gene da PRL, embora possua um sítio de ligação para o receptor de progesterona, não tem sua transcrição aumentada pelo receptor ativado *in vitro*⁴⁸.

Além da progesterona, diversos outros hormônios, fatores de crescimento e citocinas modulam a expressão de PRL endometrial⁹. Relaxina estimula a síntese e secreção de PRL pelas células estromais decidualizadas, atuando de forma sinérgica com um agonista da progesterona^{70,161,177}. O mecanismo de ação da relaxina não está bem esclarecido, mas há indícios indiretos de que seja mediado por monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). Este nucleotídeo, que atua como segundo mensageiro da relaxina em outras células alvo, também induz a secreção de PRL por células estromais de forma sinérgica com o estímulo progestogênico¹⁵³. O fator de crescimento epidérmico (EGF) estimula a proliferação de células estromais do endométrio proliferativo e potencializa o efeito da progesterona sobre a secreção de PRL após a decidualização *in vitro*⁷⁴; porém, células da decídua materna liberam menos PRL à medida que aumenta a concentração de EGF no meio de cultura¹³¹. A secreção de PRL endometrial é estimulada por IGF-I¹⁵⁷ e insulina de forma dose-dependente, sendo que a insulina atua por intermédio do seu próprio receptor¹⁵⁸. A prostaglandina E₂ acelera a diferenciação das células estromais *in vitro* e, conseqüentemente, potencializa o efeito do progestogênio sobre a liberação de PRL⁴³. A gonadotrofina coriônica humana (hCG) também estimula a secreção de PRL decidual e este efeito é, curiosamente, exercido pela subunidade alfa¹¹. Testosterona e diidrotestosterona podem estimular, de forma dose-dependente, a secreção de PRL em cultura de células estromais¹⁰⁵. O efeito dos androgênios parece ser sinérgico ao da progesterona e pode ser parcialmente revertido pela flutamida, um antagonista do receptor androgênico¹⁰⁵. No grupo das substâncias que inibem a secreção de PRL endometrial destacam-se a interleucina-1 (que também retarda a diferenciação mor-

fológica da célula estromal)⁷⁹, a lipocortina-1 (uma proteína ligadora de fosfolípidos que inibe a síntese de prostaglandinas)¹¹⁹, a endotelina-1 (que inibe inclusive a secreção de PRL estimulada por insulina e IGF-I)¹⁹ e o TNF- α ⁷⁵. A ativação da proteína quinase C e o aumento do cálcio intracelular inibem a secreção de PRL decidual por algum mecanismo independente da hidrólise de fosfatidilinositol⁸⁹.

Durante toda a gestação a decídua sintetiza PRL^{151,173}, que é transportada através das membranas fetais (córion e âmnion) e liberada no líquido amniótico¹²⁸. A concentração de PRL no líquido amniótico aumenta em paralelo com a síntese e secreção de PRL pela decídua e atinge o ponto máximo por volta do sexto mês de gravidez^{6,172}. As concentrações de PRL no sangue periférico, ao contrário, aumentam gradativamente ao longo de toda a gestação e atingem o ponto máximo no termo¹⁶⁴. Além de estar submetida a uma regulação independente, a decídua não secreta PRL na circulação materna em quantidade suficiente para influenciar as concentrações do hormônio no sangue periférico⁹. A difusão de PRL decidual para a circulação periférica é improvável especialmente na época do parto, quando os níveis de PRL no sangue placentário não superam significativamente os níveis encontrados na circulação materna⁴².

As funções da PRL decidual ainda são pouco conhecidas. Ela poderia atuar como modulador imunológico⁶, acelerar a maturação pulmonar fetal⁷⁶, influenciar o transporte de água e eletrólitos através do âmnion¹⁶³ ou modular a excitabilidade do miométrio. Contudo, essas e outras hipóteses para o papel fisiológico da PRL decidual permanecem meramente especulativas^{9,61}.

Esteróides Ovarianos

Estrogênios

O principal estrogênio de origem ovariana é o estradiol. Uma vez liberado no sangue, o estradiol se liga com grande afinidade à globulina transportadora de hormônios sexuais (SHBG) e com menor afinidade à albumina. Como apenas o hormônio livre (cerca de 3% do estradiol circulante) é biologicamente ativo, a concentração plasmática de SHBG influencia decisivamente a disponibilidade de estradiol nos tecidos alvo e, conseqüentemente, seus efeitos biológicos. A síntese hepática de SHBG e outras proteínas ligadoras de hormônios é estimulada pelo estradiol e tiroxina e inibida por androgênios e progestogênios⁵⁵. Desse controle resultam fenômenos fisiológicos, como o aumento na tiroxina total durante a gravidez (compensado pelo aumento da TBG), e patológicos, como o aumento da fração de testosterona livre em mulheres hiperandrogênicas (devido à diminuição da SHBG)^{93,141}.

Os estrogênios atuam por meio de receptores intracelulares, presentes em pequena concentração mas capazes de se ligar ao esteróide com grande especificidade e estabilidade. A ligação com o hormônio produz uma mudança na conformação espacial do receptor, que se dissocia das proteínas nucleares e torna-se biologicamente ativo. O complexo hormônio-receptor forma homodímeros que se ligam a elementos responsivos capazes de ativar ou inibir a transcrição de determinados genes⁵⁵.

O estradiol é metabolizado em estrona, que posteriormente é convertida em 16 α -hidroxiestrona e estriol, ou em catecol estrogênios que são convertidos em metoxiestrona pela catecol-orto-metiltransferase. A estrona e o estriol restantes são conjugados no fígado com sulfato e glucuronato, respectivamente; estes compostos são mais hidrossolúveis que os esteróides e podem ser excretados pelos rins.

Efeitos do estradiol sobre a proliferação celular

O estradiol estimula o crescimento e a renovação de tecidos tão diversos como hipófise¹²⁷, mama⁹⁵, pele⁵, cartilagem epifisária⁵⁵, mucosas genitais⁵⁵ e útero^{140,142}.

O exemplo mais característico do efeito mitogênico do estradiol é o crescimento que ele induz no útero de mamíferos¹⁴³. Já no ano de 1900, Knauer publicou a primeira evidência experimental da existência de um hormônio ovariano, ao demonstrar que o autotransplante de ovário prevenia a atrofia uterina resultante da castração em cobaias⁸⁶. Estudos subsequentes de Sockard & Papanicolaou sugeriram que uma substância hormonal produzida pelo ovário regularia as alterações observadas no trato genital da cobaia durante o ciclo estral¹⁴⁴. A partir do isolamento da estrona, em 1923, os estrogênios foram identificados, purificados e tiveram sua ação mitogênica bem caracterizada². Experimentalmente, a administração de doses mínimas de estradiol (inferiores a 1 µg) duplica em 24 horas o peso uterino de ratas imaturas ou castradas. O aumento de massa é acompanhado por aumento no conteúdo de RNA, DNA e proteínas, caracterizando hipertrofia e hiperplasia uterina^{140,143}. A sensibilidade dos diversos tipos celulares ao estrogênio varia com o grau de maturidade sexual. Em animais pré-púberes, estradiol produz hiperplasia do epitélio luminal e glandular, estroma e miométrio⁸⁴, mas na rata adulta castrada o efeito mitogênico se concentra apenas no epitélio glandular²⁵. Um padrão ontogênico semelhante é observado na espécie humana, que responde ao estrogênio com hiperplasia do miométrio apenas no período puberal⁵⁵.

Os mecanismos envolvidos no estímulo mitogênico do estradiol sobre o útero não estão inteiramente esclarecidos. Considerando a magnitude e a rapidez da resposta, é provável que algum mecanismo intracelular amplifique o sinal proveniente da interação inicial entre o estrogênio e seu receptor. A hipótese mais atraente é que o estradiol estimule a transcrição rápida de genes reguladores, que por sua vez coordenariam a expressão dos genes diretamente envolvidos no comando da divisão celular¹⁴³. Não se trata de uma simples cascata de

eventos, mas de uma rede complexa de fatores de crescimento, protooncogenes, proteases e citocinas (Fig. 1-1).

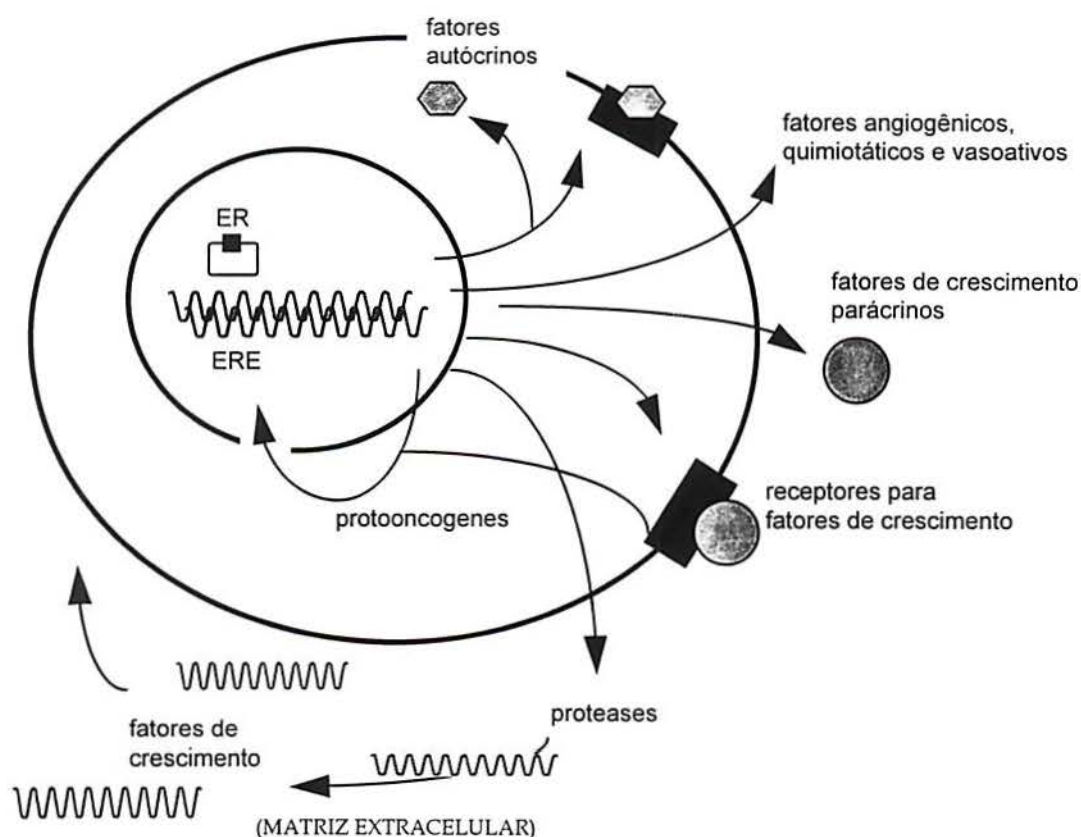


FIGURA 1-1

Mecanismos potencialmente envolvidos na amplificação do estímulo estrogênico sobre a proliferação celular in vivo. O complexo hormônio-receptor (ER) liga-se a elementos responsivos (ERE) e ativa a transcrição de fatores de crescimento (com efeito autócrino e parácrino), de receptores para estes fatores de crescimento e de protooncogenes como c-myc e c-fos. Os protooncogenes estimulam a transcrição de outros genes atuando tanto diretamente como em sinergismo com o complexo estrogênio-receptor. Proteases que têm sua síntese estimulada pelo estrogênio ativam ou liberam fatores de crescimento "seqüestrados" na matriz extracelular. Fatores angiogênicos, quimiotáticos e vasoativos facilitam o acesso de fatores de crescimento circulantes, além de células sangüíneas que também produzem fatores de crescimento. Adaptado de Murphy & Murphy¹⁰³.

Todas essas proteínas servem como pontos de amplificação, retrocontrole e modulação do sinal estrogênico, onde outras moléculas podem influenciar o efeito final do estrogênio sobre a proliferação celular. Como esse processo envolve interações entre células vizinhas, sua reprodução *in vitro* é substancialmente limitada em função da perda da arquitetura tissular¹⁰³. Além dos efeitos intracelulares, o estrogênio aumenta o fluxo de sangue no útero, favorecendo o aporte de nutrientes e fatores de crescimento circulantes, assim como a infiltração de células sangüíneas que também secretam fatores de crescimento¹⁰³.

Progesterona

A progesterona é assim denominada por ser o hormônio chave da gravidez. Seus efeitos sobre o endométrio são fundamentais para que o embrião possa se alojar e desenvolver na cavidade uterina. Por ser produzida essencialmente no corpo lúteo, a progesterona sinaliza a ocorrência da ovulação e produz muitas das transformações cíclicas que acompanham as mulheres ovulatórias. A liberação de progesterona pelo corpo lúteo é influenciada por diversos hormônios e citocinas. O principal estímulo é exercido pelo LH, que se liga aos receptores de membrana nas células da granulosa luteinizadas e ativa a produção de cAMP, seu segundo mensageiro⁹⁷. A regulação fina envolve também a participação de FSH, PRL, prostaglandinas, ativina e folistatina⁵⁶.

O transporte da progesterona no sangue é feito pela transcortina, a mesma globulina que carrega os corticosteróides. Transportadores específicos de progesterona foram identificados no fluido uterino de coelhas (uteroglobulina) e em cobaias prenhas (proteína ligadora de progesterona)^{36,100}.

O receptor de progesterona pertence a uma grande família de proteínas reguladoras de transcrição gênica ativadas por ligantes, que também inclui receptores para os outros hormônios esteróides, retinóides, hormônio tireoidiano e vitamina D. O receptor biologicamente ativo é um dímero em cuja composição podem participar duas variedades de proteína, denominadas "PR A" e "PR B".

Ambas são codificadas pelo mesmo gene e se diferenciam por 164 aminoácidos aminoterminais presentes apenas na variedade B⁸⁰. A ligação da progesterona ao domínio específico localizado na região carboxiterminal do receptor produz um complexo (receptor dimerizado e duas moléculas de progesterona) que se liga a elementos responsivos na região reguladora dos genes alvo, ativando ou reprimindo a transcrição gênica⁵⁶.

A progesterona é metabolizada em esteróides ativos (corticosteróides, estrogênios ou androgênios) ou inativos (pregnanolona e pregnanediol). Estes últimos são produzidos no fígado pela ação de redutases (5 α -redutase, nos microsomos, e 5 β -redutase, no citoplasma) que quebram as duplas ligações do anel A e introduzem um hidrogênio no carbono 5. Após a redução, que gera subprodutos inativos, segue-se a conjugação com glucosiduronidato, catalisada pela sulfotransferase, que resulta em compostos hidrossolúveis, passíveis de excreção urinária.

Efeitos da progesterona sobre a proliferação e diferenciação de tecidos alvo

Os efeitos da progesterona sobre a proliferação celular são muito diversificados. Eles variam de um tipo celular para outro no útero e mama de um mesmo animal, enquanto o mesmo tipo celular, em espécies animais distintas, responde diferentemente à progesterona ao longo do ciclo reprodutivo^{26,102}. Quando induz proliferação celular, a progesterona o faz de modo transitório, autolimitado, apenas preparando o tecido para a diferenciação. Este efeito pode ser observado na camada funcional do endométrio secretor tardio³⁸ e na glândula mamária⁵⁶.

O efeito predominante da progesterona sobre o útero é inibir a proliferação induzida por estrogênio. O estímulo estrogênico durante a fase folicular do ciclo menstrual produz intensa atividade proliferativa nas glândulas e no estroma endometrial, mas as mitoses desaparecem com a elevação pós-ovulatória dos níveis de progesterona³⁸. Esta observação histológica é corroborada pela dosagem de DNA em amostras de endométrio ao longo do ciclo menstrual⁹¹ e

em pacientes menopausadas que fizeram reposição hormonal¹⁷⁰. A progesterona inibe a expressão do receptor estrogênico no endométrio humano^{47,162} e no miométrio da rata⁶⁹, e estimula a atividade de estradiol desidrogenase e sulfotransferase, reduzindo a disponibilidade intracelular de estrogênio ativo^{16,137}. Além disso, a progesterona atua nos próprios elementos promotores responsivos ao estrogênio, inibindo a transcrição gênica. Experimentos recentes demonstraram que este efeito independe da ligação do complexo progesterona-receptor ao DNA, sugerindo que o receptor de progesterona seqüestraria parte dos fatores de transcrição utilizados pelo receptor de estrogênio⁸⁸.

A progesterona induz a diferenciação do endométrio, caracterizada pela atividade secretora das glândulas e pela decidualização dos “fibroblastos” estromais. Sob efeito progestogênico, as células endometriais sofrem diferenciação terminal, isto é, adquirem funções especializadas e perdem a capacidade de se multiplicar²⁶. Juntamente com a diferenciação morfológica, a progesterona induz a síntese e secreção de substâncias que preparam o endométrio para a implantação do blastocisto. Glicogênio, PRL e proteínas da matriz extracelular estão entre elas.

A síntese e secreção de glicogênio pelas glândulas endometriais é induzida pela progesterona *in vitro* e aumenta dramaticamente na fase secretora do ciclo menstrual, refletindo aumento de atividade das enzimas glicogênio sintetase e glicogênio fosforilase^{26,139}. A secreção de PRL endometrial é característica da fase secretora do ciclo menstrual^{82,99} e necessita do estímulo contínuo da progesterona para prosseguir^{28,70,124}. O efeito da progesterona sobre a secreção de PRL em cultura de células estromais é dose e tempo-dependente¹²⁴ e pode ser revertido pela adição de mifepristona, o que sugere um mecanismo de ação dependente do receptor progestínico⁷⁰. Quanto às proteínas da matriz extracelular, a progesterona inibe a síntese de estromelisina-1 no estroma endometrial, num efeito dependente da pré-exposição a estrogênio e reversível pelo antagonista mifepristona¹³⁶. A progesterona também inibe a secreção de matri-lisina por células do epitélio endometrial humano mantidas em cocultura com

células estromais, sendo este efeito revertido por um anticorpo anti-TGF β ¹⁵. Estromelisina-1 e matrilisina são metaloproteinases, enzimas envolvidas na degradação de componentes da matriz extracelular e na remodelação de tecidos. A progesterona também estimula a síntese de uma proteína anti-angiogênica no estroma endometrial, a trombospondina-1⁷².

Progestogênios

Os progestogênios são esteróides que mimetizam os efeitos da progesterona. Um composto é considerado progestogênio quando é capaz de transformar o endométrio proliferativo em secretor. Com base neste conceito, novas drogas têm sua ação progestogênica testada em bioensaio padronizado, utilizando endométrio de coelhas imaturas. O único progestogênio natural de importância biológica é a própria progesterona. Os progestogênios sintéticos se dividem em duas famílias, derivadas da 17-OH progesterona e da 19-nortestosterona, respectivamente.

O acetato de medroxiprogesterona (MPA) é um progestogênio derivado da 17-OH progesterona, ativo tanto por via oral quanto parenteral (Fig. 1-2). Comparado a outros progestogênios, o MPA é altamente seletivo – menos androgênico e mais luteomimético. Sua potência é superior à da progesterona natural quanto à capacidade de diferenciar as células endometriais *in vitro*⁹⁰ ou *in vivo*⁸³.

Administrado por via oral, o MPA tem meia-vida inicial de 1,4 hora e final de 20 a 30 horas, contrastando com a progesterona natural que tem meia-vida de apenas 5 min. O pico de concentração plasmática é atingido com 1 a 2 horas e os níveis terapêuticos são mantidos estáveis quando se administra a mesma dose a cada 24 horas¹⁷. Quando se interrompe o tratamento após múltiplas administrações por via oral, os níveis plasmáticos de MPA decaem com meia-vida de aproximadamente 30 horas¹⁸. Assim como ocorre com a progesterona natural, o MPA é metabolizado no fígado e seus subprodutos são excretados na urina.

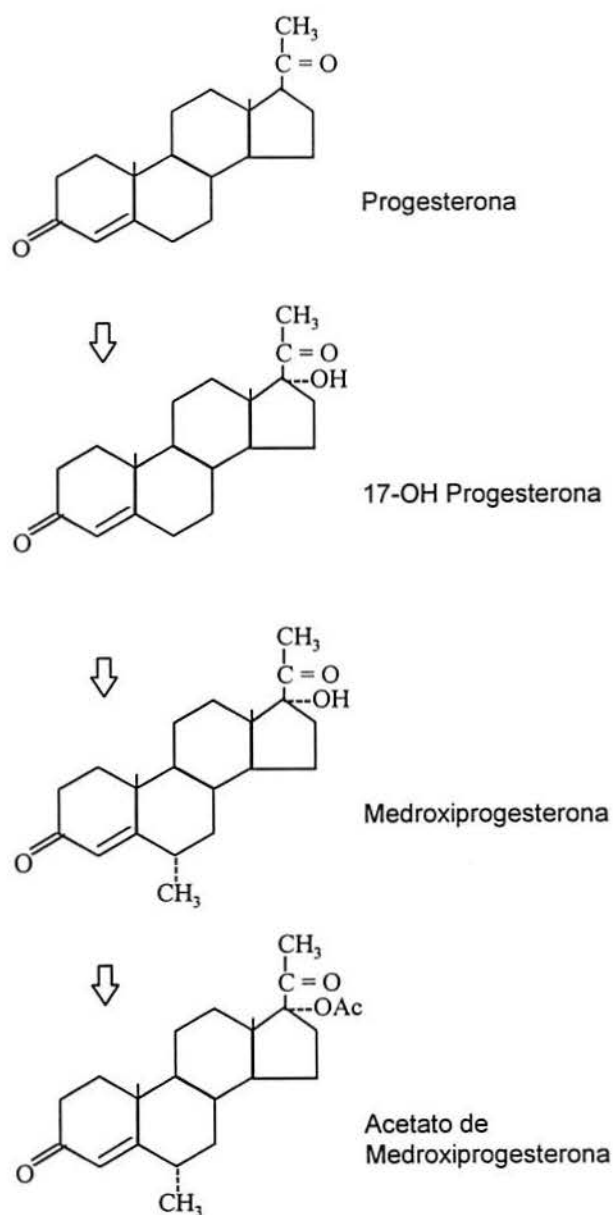


FIGURA 1-2

Estrutura química do acetato de medroxiprogesterona e seus precursores. O grupos metil no carbono 6 e acetoxi no carbono 17 tornam o composto mais estável que a progesterona natural.

Fatores de crescimento e protooncogenes

Neste tópico abordaremos alguns aspectos fisiológicos dos principais fatores de crescimento e protooncogenes identificados no endométrio humano, com ênfase na sua localização histológica, relação com o ciclo menstrual, efeitos locais (parácrinos e autócrinos) e interação com esteróides sexuais.

Insulina, IGF-I, IGF-II e IGFBPs

O endométrio possui receptores para insulina e IGF-I¹⁵⁸. A insulina circulante liga-se a esses receptores e parece exercer um papel modulador sobre a proliferação e diferenciação das células endometriais, regulando particularmente a secreção de IGFBPs^{51,73}.

Ao contrário da insulina, que tem sua expressão restrita a pouquíssimos sítios além do pâncreas, IGF-I e IGF-II são sintetizados por uma grande variedade de tecidos, incluindo o endométrio, onde exercem efeitos parácrinos⁵⁷. A síntese de IGF-I no endométrio humano predomina na fase proliferativa e é detectada somente até o início da fase secretora. A expressão gênica de IGF-II pode ser identificada no endométrio durante todo o ciclo menstrual, mas é muito acentuada a partir da fase secretora intermediária^{50,52}. A síntese de IGF-I e IGF-II no útero da rata é fortemente estimulada pela administração de estradiol^{50,104}; o efeito da progesterona não está suficientemente bem caracterizado, mas há indícios tanto de estímulo quanto de inibição da síntese uterina de IGF-I, dependendo da espécie animal⁵⁷. Em cultura de células estromais, IGF-I e IGF-II tem um efeito bifásico em função da dose. Em baixas concentrações, estimulam a secreção de IGFBP-1, mas em concentrações elevadas inibem a secreção de IGFBP-1 e induzem proliferação celular⁷³. O papel fisiológico mais provável dos IGFs no endométrio é atuar como mediadores dos esteróides no controle da proliferação celular, diferenciação decidual e implantação^{37,50}.

Receptores de IGF do tipo I e II estão presentes no endométrio e no miométrio. A concentração do receptor tipo I no útero da rata é influenciada pelo ci-

clo estral⁴⁹, mas a síntese e a expressão dos dois tipos de receptor no endométrio humano não variam significativamente ao longo do ciclo menstrual^{37,57,176}. Em cultura de glândulas endometriais humanas, observou-se um aumento de 50% na concentração de receptores para IGF-I (estimada por *binding*) quando as células foram estimuladas com progesterona durante 10 dias, em contraste com o estradiol, que não produziu qualquer efeito¹²⁶.

Um fator que aumenta a complexidade do sistema IGF são as IGFBPs, proteínas ligadoras de alta afinidade que competem com o receptor de IGF pelo ligante e assim modulam o efeito final do IGF-I e IGF-II. Seis tipos de IGFBP já foram caracterizados e todos eles são produzidos pelo endométrio, com diferentes padrões de expressão ao longo do ciclo menstrual¹⁷⁶. A síntese de IGFBP-1 é detectada somente no endométrio secretor e apresenta um padrão histológico focal, com mRNA presente tanto no estroma como no epitélio^{51,176}. As outras proteínas ligadoras, com exceção da IGFBP-5, também são sintetizadas em maior quantidade durante a fase secretora do ciclo menstrual¹⁷⁶. Esse padrão é provavelmente imposto pela progesterona, como sugerem os experimentos com cultura de células estromais, em que a progesterona estimula a secreção de IGFBP-1⁵¹. A regulação desta proteína é tão precisa que alguns autores demonstraram a possibilidade de usá-la como marcador de resposta endometrial à terapia de reposição hormonal no climatério^{146,147}.

EGF e TGF- α

O primeiro fator de crescimento a ser descoberto²⁷ e o mais bem estudado até o momento é o fator de crescimento epidérmico (EGF). Síntese, secreção e efeitos biológicos do EGF são observados numa grande variedade de tecidos, inclusive no sistema reprodutor^{50,101}. Especificamente no endométrio humano, estudos com imuno-histoquímica demonstraram a presença de EGF durante todo o ciclo menstrual^{20,66,121}. O peptídeo foi identificado tanto no estroma como no epitélio luminal e glandular, mostrando um possível aumento de expressão na fase secretora⁶⁶ que não foi confirmado por estudos posteriores^{20,121}. Mais

recentemente, demonstrou-se a presença de mRNA do EGF e EGF-R em biópsias de endométrio e decídua⁵⁹, em homogenatos de útero e ovário fetais¹⁷⁴, em cultura de células do miométrio e de miomas uterinos¹⁷⁵ e em células estromais decidualizadas *in vitro*¹³². O endométrio contém uma quantidade expressiva de EGF-R, cuja expressão parece ser controlada pelos esteróides sexuais. Embora a imunocoloração para EGF-R no endométrio não apresente grandes variações cíclicas²⁰, a concentração e afinidade desses receptores, determinadas por estudos de *binding*, são muito maiores durante a fase proliferativa¹². Entretanto, o exato papel do estradiol e da progesterona na regulação do EGF-R ainda não foi esclarecido. Em cultura de células o estradiol parece reduzir a concentração desses receptores, o que poderia ser explicado pelo aumento na secreção do próprio EGF e a conseqüente contrarregulação (*down regulation*)^{50,126}. A principal função do EGF no útero e na vagina é potencializar o estímulo do estrogênio sobre a proliferação celular^{74,108,131}.

A síntese de TGF α no endométrio humano foi demonstrada pela primeira vez com o auxílio de uma técnica ultra-sensível, a dupla amplificação por reação em cadeia de polimerase (*nested* RT-PCR). O fragmento de cDNA obtido apresentava exatamente a seqüência conhecida do TGF α humano⁵⁹. Apesar da transcrição em pequena escala, o TGF α pode ser facilmente identificado no endométrio em todas as fases do ciclo menstrual por meio de imuno-histoquímica⁶⁷. A mesma técnica permitiu a localização de TGF α na decídua e no trofoblasto, especialmente durante o primeiro trimestre gestacional⁶⁷. A injeção de estradiol aumenta a transcrição do gene do TGF α no útero de animais ovariectomizados^{14,109}, mas a regulação da síntese de TGF α pelos esteróides sexuais no endométrio humano ainda não foi bem caracterizada⁵⁷. Assim como o EGF e, atuando sobre o mesmo receptor, o TGF α atua como mediador do efeito proliferativo do estrogênio sobre o útero¹⁰⁹.

Outros Fatores de Crescimento (PDGF, FGF)

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é um potente estimulador de mitoses em cultura de células mesenquimais⁵⁰. Em cultura de células estromais, a adição de PDGF não tem efeito isolado, mas potencializa o efeito proliferativo dos esteróides sexuais⁷⁴. Imunorreatividade para PDGF-AB foi demonstrada no endométrio humano, ficando sua expressão restrita às células estromais e sem variação ao longo do ciclo menstrual²⁰. Observou-se também imunocoloração para o receptor PDGF- β no epitélio e no estroma. A coloração foi mais intensa durante a fase proliferativa, particularmente nas células estromais²⁰. Esses dados sugerem que o PDGF seja mais um fator mitogênico a amplificar o sinal do estrogênio no endométrio.

O fator de crescimento de fibroblastos (FGF) é uma proteína angiogênica que parece estar envolvida no processo de vascularização do endométrio normal e patológico^{41,54,60}, bem como no processo de invasão trofoblástica durante o primeiro trimestre da gravidez⁴⁰. Durante o ciclo menstrual não se observam variações significativas na síntese ou secreção de FGF ácido ou básico no endométrio⁴¹. A imunocoloração para ambas as formas de FGF se concentra no epitélio glandular e pode ser observada igualmente em tecido endometrial ectópico^{41,54}. A secreção de FGF básico é estimulada por estradiol e inibida por progesterona em células endometriais neoplásicas¹²³. Apesar do seu potente efeito mitogênico sobre células estromais normais em cultura⁷⁴, a importância do FGF como indutor de multiplicação celular e neovascularização no endométrio humano ainda não foi suficientemente comprovada⁵⁰.

Fator de Crescimento "Transformante" beta (TGF β)

O fator de crescimento que exerce funções mais complexas e aparentemente paradoxais é o TGF β . Identificado com o processo de diferenciação celular em vários tecidos, o TGF β pode ser tanto indutor como inibidor de crescimento⁵⁰. Sua participação parece ser fundamental no processo de cicatrização e

reconstituição de tecidos lesados¹³. O primeiro TGF β foi isolado em 1981 e descrito como um fator capaz de estimular o crescimento de fibroblastos renais de rato cultivados em ágar, diferenciando-se do TGF até então conhecido (TGF α) pelo fato de não competir com o EGF pelo mesmo receptor¹²⁹. Purificado e caracterizado bioquimicamente nos anos seguintes, o TGF β teve seu cDNA clonado e seqüenciado em 1985 a partir de várias linhagens celulares malignas, de linfócitos periféricos normais e também a partir da placenta³⁰. Entre 1987 e 1988, quatro equipes independentes identificaram dois novos tipos de TGF β , que foram respectivamente denominados TGF β 2^{29,94} e TGF β 3^{31,156}, fazendo com que o TGF β originalmente descrito passasse a ser denominado TGF β 1. Dois tipos adicionais de TGF β foram descritos posteriormente, mas apenas em animais não mamíferos⁵⁷. O receptor de TGF β é o mesmo para todas as isoformas e está presente numa grande variedade de tecidos⁵⁰.

A síntese de TGF β no sistema reprodutor está associada ao controle inibitório da proliferação celular. Em células mamárias neoplásicas positivas para receptor estrogênico, a transcrição gênica de TGF β 2 e TGF β 3, mas não de TGF β 1, é inibida pelo estradiol após dois dias de incubação⁴. O crescimento da linhagem MCF-7 de células malignas da mama foi inibido de forma dose-dependente por TGF β 1 e TGF β 2, sendo aquele um inibidor mais potente⁴. A expressão de TGF β , avaliada por imuno-histoquímica, foi mais freqüentemente observada em tecido ovariano neoplásico (benigno ou maligno) que no tecido normal. Porém, a sobrevivência das portadoras de tumor ovariano de origem epitelial foi substancialmente maior (cerca de 80% *vs* 40% em 4 anos) quando o tumor era imunopositivo para TGF β 1⁶².

A identificação de TGF β e do seu mRNA no endométrio humano foi possível com técnicas de imuno-histoquímica e hibridização *in situ*. Todos os tecidos uterinos estudados, inclusive o miométrio, sintetizam e secretam as três formas de TGF β , mas há diferenças entre as camadas e os tipos celulares do endométrio quanto à intensidade e à regulação hormonal^{21,54}. A imunocoloração para TGF β 3

varia com o ciclo menstrual apenas no epitélio glandular, sendo mais intensa durante a fase secretora⁵⁴. Já a coloração específica para TGF β 1 e TGF β 2 não difere entre espécimes endometriais obtidos nas duas fases do ciclo⁵⁴. A concentração de mRNA dos três tipos de TGF β aumenta no fim da fase proliferativa e se mantém máxima até meados da fase secretora, caindo novamente no período perimenstrual^{21,81,98}. Os relatos são divergentes quanto à localização do mRNA do TGF β no endométrio, ora mostrando um predomínio no epitélio²¹, ora no estroma⁹⁸. O efeito dos esteróides sexuais sobre a expressão endometrial de TGF β *in vitro* é ainda mais complexo e sugere uma regulação independente das três isoformas de TGF β ^{3,78}.

Os efeitos do TGF β no endométrio humano variam conforme o tipo celular estudado e as condições experimentais. Em células epiteliais, a síntese de DNA (medida pela incorporação de timidina tritiada) é inibida pelo TGF β 1 de forma dose-dependente, numa larga faixa de concentrações⁹⁸. Em células estromais condicionadas com soro bovino fetal, os três tipos de TGF β têm comportamento bifásico: em baixas concentrações aumentam a síntese de DNA e em altas concentrações perdem esse efeito, passando a inibir a atividade metabólica das células^{98,154}. A especificidade do TGF β nesses ensaios é comprovada pela reversão dos seus efeitos com anticorpos específicos desenvolvidos contra as três isoformas¹⁵⁴. Recentemente se observou que o TGF β produzido pelas células estromais atua sobre o epitélio glandular adjacente, inibindo a secreção de matrilisina e, conseqüentemente, favorecendo a integridade da matriz extracelular¹⁵.

O conjunto desses dados, ainda preliminares, sugere que esta família de peptídeos atua em duas etapas distintas, conforme a fase do ciclo menstrual¹⁵⁴: os níveis discretos de TGF β produzidos na fase proliferativa estimulariam a proliferação celular em conjunto com outros fatores, como EGF e PDGF; na fase secretora, níveis mais altos de TGF β contribuiriam para limitar o crescimento e estimular a diferenciação celular. Isso faria do TGF β um importante candidato a mediador parácrino das ações da progesterona sobre o endométrio.

Protooncogenes (c-fos, c-myc, c-ras, c-jun)

Alguns retrovírus induzem transformação neoplásica em células de mamíferos, introduzindo-lhes uma seqüência gênica mutante que guarda estreita semelhança com genes nativos do hospedeiro. Esses fragmentos virais são denominados oncogenes (*v-onc*) e seus homólogos celulares normais são chamados protooncogenes (*c-onc*). A transcrição de quatro desses protooncogenes – *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* e *c-ras* – foi documentada no endométrio humano e em outros tecidos hormônio-sensíveis, e parece estar associada à proliferação celular fisiológica induzida pelos hormônios esteróides^{103,165}. A expressão de *c-fos* também está aumentada em tumores malignos do colo do útero²², da mama¹⁶⁶ e dos ossos¹⁷¹.

A presença das proteínas codificadas por *c-ras* e *c-myc* foi demonstrada por imuno-histoquímica em biópsias endometriais humanas, sendo que a primeira não apresentou variação cíclica e a segunda predominou durante a fase proliferativa do ciclo menstrual¹¹³. A presença de mRNA do *c-fos* e *c-jun* foi identificada no endométrio humano nas duas fases do ciclo menstrual, sendo que, durante a fase proliferativa, a expressão gênica de *c-fos* foi mais intensa no endométrio que no miométrio adjacente¹³³. Em suínos foi observada a presença de *c-fos* (mRNA e proteína) nas células epiteliais do endométrio durante todo o ciclo estral, bem como no início da gravidez³⁴. Em camundongos, imunorreatividade para a proteína *fos* foi observada tanto no epitélio quanto no estroma endometrial nos primeiros dias de gravidez e pseudo-prenhez⁷.

A regulação hormonal da síntese de *c-fos* no útero foi bem caracterizada em murinos⁹². A injeção de estradiol aumentou a transcrição de *c-fos* de forma dose-dependente na rata adulta¹¹⁵ ou imatura^{23,85} ovariectomizada. O efeito do estradiol foi revertido pela progesterona também de maneira dose-dependente, por um mecanismo independente da ocupação dos receptores estrogênicos⁸⁵. A concentração de mRNA do *c-fos* em fibroblastos endometriais humanos aumenta na presença de estradiol e esse efeito é revertido pela adição de progesterona⁴⁶.

O estímulo do estrogênio sobre a transcrição de *c-fos* é resultante da ligação do complexo hormônio-receptor ao DNA. A região reguladora do gene do *c-fos* humano possui um elemento responsivo ao estrogênio (ERE), que recentemente foi seqüenciado e caracterizado¹⁶⁹. Porém, ainda nos falta uma compreensão ampla dos mecanismos endócrinos e parácrinos que regulam a expressão deste e de outros protooncogenes. Além da influência estrogênica e da modulação pela progesterona, a transcrição de *c-fos* parece ser controlada por hormônios peptídicos e fatores de crescimento que utilizam a via da proteína quinase C^{35,46,143}. Até o presente momento, não se conhecem os efeitos da interação estradiol-progesterona *in vivo* sobre a expressão de protooncogenes no endométrio humano.

Objetivos

Em face das lacunas existentes acerca dos mecanismos moleculares (parácrinos e autócrinos) envolvidos no crescimento e diferenciação do endométrio humano, e considerando a importância de se utilizar modelos experimentais controlados para estudar o efeito dos esteróides sexuais sobre a regulação de fatores de crescimento e protooncogenes, o presente trabalho foi idealizado com os seguintes objetivos:

Objetivo geral

Identificar possíveis mediadores e/ou indicadores da ação dos esteróides sexuais no processo de diferenciação do endométrio humano.

Objetivos específicos

- Investigar o efeito do acetato de medroxiprogesterona sobre a expressão de PRL, *c-fos*, TGFβ1 e TGFβ3 no endométrio humano, identificando o mRNA e a respectiva proteína imunorreativa;

-
- Avaliar esses mesmos parâmetros no endométrio obtido em diferentes fases do ciclo menstrual;
 - Correlacionar a expressão endometrial de PRL, *c-fos* e TGF β com os níveis séricos de esteróides sexuais e com a morfologia do endométrio durante o ciclo menstrual.
-

Material e Métodos

Delineamento Experimental

Modalidade de estudo

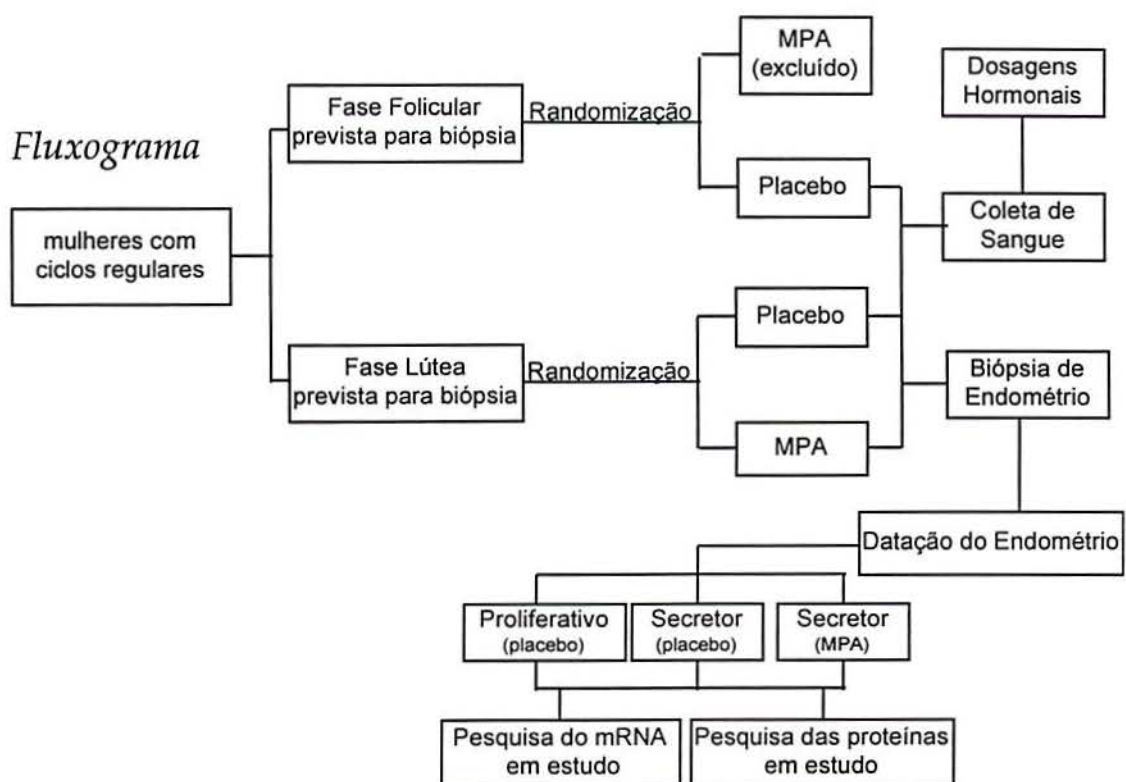
- Experimento clínico duplo-cego controlado por placebo.

Fatores em estudo

- Acetato de medroxiprogesterona 10mg/dia, 10 dias;
- Ciclo menstrual;
- Estradiol sérico, progesterona sérica e relação progesterona/estradiol.

Principais Desfechos

- Presença de PRL, *c-fos*, TGF β 1 e TGF β 3 no endométrio;
- Concentração de mRNA da PRL, *c-fos*, TGF β 1 e TGF β 3 no endométrio.



Considerações Éticas

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (resolução 196/96, projeto 96279) e pela Comissão de Ética do Hospital Presidente Vargas. As pacientes, recrutadas no ambulatório de ginecologia geral do Hospital Presidente Vargas, foram informadas sobre o objetivo do estudo e assinaram um termo de consentimento (anexo 2).

A medroxiprogesterona é uma droga utilizada há muitos anos e, nas doses preconizadas, não oferece risco significativo para a saúde (“risco mínimo”). Os efeitos colaterais são brandos e prontamente reversíveis. As pacientes foram alertadas sobre esses efeitos e estimuladas a informar o pesquisador, por telefone, se porventura os apresentassem.

Pacientes

Crítérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídas mulheres em idade reprodutiva, com história de ciclos menstruais regulares, que soubessem informar as datas das 3 últimas menstruações. Não foram incluídas no estudo mulheres que apresentassem pelo menos uma das características a seguir:

- Uso de qualquer medicamento hormonal nos últimos 3 meses;
- Uso de medicamentos hormonais de depósito nos últimos 6 meses;
- Uso atual de dispositivo intra-uterino (DIU) não medicado;
- Uso de DIU medicado nos últimos 6 meses;
- História ou evidência de patologia endometrial;
- Índice de massa corporal superior a 35 kg/m²;
- Vulvovaginite em atividade;
- Atividade sexual sem proteção contraceptiva.

Das 315 pacientes atendidas entre setembro/1996 e fevereiro/1997, 49 preencheram os critérios de inclusão e, destas, 46 aceitaram participar do estudo.

Randomização

As pacientes elegíveis e que concordaram em participar do estudo receberam um frasco numerado contendo 10 comprimidos de placebo ou MPA. O conteúdo do frasco era ignorado tanto pela paciente quanto pelo autor, médico responsável pela seleção. Uma tabela de randomização foi elaborada por outro pesquisador e mantida em sigilo até a fase final de coleta das amostras (anexo 4).

A randomização simples não é recomendada para amostras da ordem de dezenas de pessoas, porque existe uma alta probabilidade de alocação desigual de indivíduos para os diversos tratamentos ¹²⁰. Optou-se, então, por uma randomização estratificada e por blocos, que será detalhada a seguir. Com o objetivo de pré-determinar o número de participantes que receberiam placebo ou MPA nas duas fases do ciclo menstrual, as participantes foram divididas inicialmente em dois estratos, de acordo com a fase do ciclo menstrual em que se encontravam (ver fluxograma). Havia um conjunto de frascos numerados para as pacientes que fariam a biópsia de endométrio entre o 5º e 12º dias do próximo ciclo menstrual (fase folicular) e outro para as que fariam a biópsia entre o 16º e o 28º dias do ciclo (fase lútea). Uma vez definida a época provável da biópsia (fase folicular ou fase lútea), a paciente recebia o próximo frasco de medicamento disponível, seguindo uma numeração contínua. Para que houvesse uma proporção adequada de pacientes alocadas para receber placebo ou MPA dentro de cada estrato (fase folicular ou fase lútea), utilizou-se o sistema de randomização em blocos com a seguinte proporção:

- fase folicular (n=16): 4 blocos de 4 frascos, sendo 3 com placebo e 1 com MPA;
- fase lútea (n=30): 10 blocos de 3 frascos, sendo 2 com placebo e 1 com MPA.

A técnica da randomização em blocos consiste em prever todas as combinações de tratamento possíveis num bloco de n indivíduos, designando cada combinação por uma letra. Por exemplo, no nosso estrato da fase lútea, a combinação "A" seria Placebo-Placebo-MPA, a combinação "B" seria Placebo-MPA-Placebo e a combinação "C" seria MPA-Placebo-Placebo. Ao recorrer à

tabela de números aleatórios para proceder à randomização, o sorteio determinou a seqüência das combinações (no exemplo acima, B-A-B-B-B-B-C-C-A) e as combinações determinaram a seqüência de tratamentos. Com isso garantimos que, a cada 3 pacientes alocadas, duas teriam recebido placebo e uma teria recebido MPA. Como a ordem das combinações era mantida em sigilo e a randomização só foi quebrada ao final da etapa de coleta das amostras, era impossível para o médico encarregado da seleção descobrir qual tratamento seria destinado à próxima paciente ¹²⁰.

Tratamento

Todas as pacientes receberam frascos numerados, com a mesma aparência, contendo 10 comprimidos cada. Os comprimidos de MPA foram de 10 mg, da marca Provera[®], cedidos pelo laboratório Upjohn. Os placebos foram elaborados sob encomenda e continham apenas amido. Junto com o frasco as pacientes receberam uma prescrição detalhada que incluía a data de início e término do tratamento. Todas foram orientadas a ingerir 1 comprimido por dia, à noite, ao deitar. Na manhã seguinte ao 10º e último dia de medicação, as pacientes retornaram ao ambulatório para coleta de sangue e biópsia de endométrio. Foram então questionadas sobre o cumprimento integral da prescrição e convidadas a devolver o frasco usado.

Coleta de Sangue e Preparo das Amostras

Chegando ao ambulatório, as pacientes descansaram por cerca de 30 min na sala de espera e por mais 15 min no consultório. Todos os procedimentos foram detalhadamente explicados antes e durante a sua realização. Através de punção venosa no antebraço foi coletada uma amostra de 5 ml de sangue que foi mantida à temperatura ambiente, sem anticoagulante, por cerca de 2 horas. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 10 min e o soro foi estocado em três alíquotas de 0,6 ml, a -20°C, até o momento das dosagens hormonais.

Biópsia de Endométrio

Cerca de 12 a 14 horas após a ingestão do último comprimido as pacientes foram submetidas à biópsia de endométrio. O procedimento foi feito sem analgesia, por meio de aspiração, utilizando-se uma sonda descartável siliconizada nº 8 (MarkMed Ltda., São Paulo) adaptada a uma seringa de 20 ml. A sonda era introduzida no canal cervical exposto com espécuro mas não tracionado, e era manipulada pela mão direita com o auxílio de uma pinça enquanto a mão esquerda produzia vácuo na seringa. Com movimentos suaves procurou-se amostrar o fundo e as paredes anterior e posterior da cavidade uterina. Nenhuma paciente apresentou sintomas graves ou reação autonômica intensa; apenas 1/4 das pacientes relatou cólica discreta e momentânea durante a biópsia.

O material aspirado foi disposto sobre uma gaze estéril para diminuir o conteúdo de sangue. Metade da amostra foi imediatamente inserida num tubo plástico estéril de 2 ml (tubo de microcentrifugação) e congelada em nitrogênio líquido. Num prazo máximo de 2 horas este material foi removido do nitrogênio e estocado num freezer a -70°C até o momento da extração do RNA.

A outra metade da amostra foi lavada em solução fisiológica estéril e fixada em formaldeído a 10% durante cerca de 2 meses, até o preparo dos cortes histológicos.

Histologia e Imuno-histoquímica

Preparo das lâminas

As lâminas de vidro foram inicialmente lavadas com detergente e enxaguadas em água destilada. Depois foram rapidamente imersas em ácido clorídrico 1N e enxaguadas em água destilada. A seguir, foram mergulhadas em ácido acético (diluído a 1:4 em etanol) por 20 min e deixadas secar por uma noite à temperatura ambiente.

No segundo dia, as lâminas foram imersas por três períodos de 2 min sucessivamente em acetona absoluta, 3-aminopropiltrietoxissilano (Sigma Chem. Co., St. Louis MO, USA) diluído a 1:50 em acetona e, novamente, acetona absoluta. O 3-aminopropiltrietoxissilano, também chamado de organossilano, é um adesivo de grande resistência que permite que as lâminas sejam expostas a altas temperaturas ou incubadas com tripsina, quando isso é necessário para expor os sítios antigênicos.

Inclusão e Corte

As amostras fixadas em formaldeído foram desidratadas em etanol a concentrações crescentes, variando de 70% a 99% (60 min cada), depois imersas em xilol (2 x 60 min) e em parafina a 60° (idem). A seguir foram incluídas em blocos de parafina deixados solidificar por pelo menos 24 horas.

Os blocos foram resfriados a cerca de -10°C e seccionados num micrótomo em cortes de 4 µm de espessura que, dispostos num banho aquecido, foram delicadamente transferidos para as lâminas de vidro. A seguir, as lâminas foram aquecidas em estufa a 60°C por 20 min para deixar escorrer o excesso de parafina dos cortes histológicos.

Uma lâmina de cada paciente foi submetida à coloração de rotina por hematoxilina-eosina para permitir a datação histológica do endométrio.

Datação das Biópsias Endometriais

As amostras endometriais coradas por hematoxilina-eosina foram examinadas segundo os critérios de Noyes¹¹² para datação histológica. As principais características observadas foram o formato do epitélio luminal, o tamanho, densidade e formato das glândulas endometriais, a espessura, densidade e grau de edema do estroma, a presença de vacúolos periféricos no epitélio glandular e de secreção na luz das glândulas. Os critérios correspondentes a cada fase do ciclo menstrual estão sintetizados na tabela 2-1.

TABELA 2-1

CrITÉrios adotados para datação da biÓpsia endometrial. Adaptado de Noyes et al.¹¹².

Endométrio	Características
Proliferativo inicial	Epitélio luminar cúbico, poucas glândulas de pequeno diâmetro no estroma denso.
Proliferativo intermediário	Epitélio luminar cilíndrico, estroma edemaciado e com muitas glândulas de pequeno diâmetro; epitélio glandular em monocamada.
Proliferativo tardio	Presença de glândulas endometriais tortuosas com pseudoestratificação do epitélio glandular; diminuição do edema estromal.
Periovulatório	Presença de vacúolos basais no epitélio glandular.
Secreter inicial	Presença de secreção na luz glandular e ainda de alguns vacúolos; reinício do edema estromal.
Secreter intermediário	Ponto máximo do edema estromal. A partir do 9º dia pós-ovulação observam-se arteríolas espiraladas.
Secreter tardio	Decidualização estromal predominante na vizinhança das arteríolas espiraladas.
Menstrual	Focos hemorrágicos no estroma e desintegração da camada compacta.

Técnica da Avidina-Biotina-Peroxidase

A técnica da Avidina-Biotina-Peroxidase é também conhecida por Complexo Avidina-Biotina (ABC) (Fig. 2-1). Esta técnica é fundamentada na grande afinidade da avidina (uma glicoproteína de alto peso molecular) pela biotina (uma vitamina que pode ser conjugada a enzimas, anticorpos e substâncias fluorescentes). O tecido é incubado com um anticorpo primário (mono ou policlonal) específico para a proteína em estudo. Em seguida, aplica-se um anticorpo secundário (que tem o anticorpo primário como alvo) previamente ligado a uma molécula de biotina. A avidina atua como amplificador de efeito, pois cada molécula de avidina que se acopla à biotina do anticorpo secundário liga-se simultaneamente a três outras moléculas de biotina conjugadas à peroxidase. A peroxidase atua sobre um corante especial e os sítios antigênicos ficam corados de forma estável, geralmente em tonalidade castanha.

A seguir serão descritas as etapas básicas da técnica da avidina-biotina-peroxidase padronizada por Hsu⁶⁸ e modificada por Barbosa-Coutinho⁸, conforme previamente relatado^{114,127,140,142}. Um fluxograma que permite reproduzi-la passo a passo é apresentado na figura 2-2 e as adaptações e particularidades do nosso protocolo para cada antígeno estudado são apresentadas na tabela 2-2.

Os cortes foram desparafinizados em xilol (2 incubações de 10 min) e reidratados em concentrações decrescentes de etanol que variaram de 99% a 70%, sendo finalmente imersos por 5 min em água destilada. A etapa seguinte foi a incubação dos cortes com uma solução de tripsina bovina em PBS (1 mg/ml) durante 30 a 45 min, destinada a expor os sítios antigênicos. A terceira etapa foi a inibição da peroxidase endógena a fim de evitar sua reação com o corante fora dos sítios antigênicos específicos. Para isso, os cortes foram incubados por 30 min em uma solução de peróxido de hidrogênio a 1% em metanol e depois lavados em PBS por 10 min. Seguiu-se uma incubação dos cortes durante 30 min com soro normal de cabra ou coelho (conforme a origem do anticorpo secundário) com o objetivo de ocupar os sítios antigênicos inespecíficos e favorecer a ligação

do anticorpo secundário biotinilado ao seu antígeno alvo, que é o anticorpo primário (Fig. 2-1).

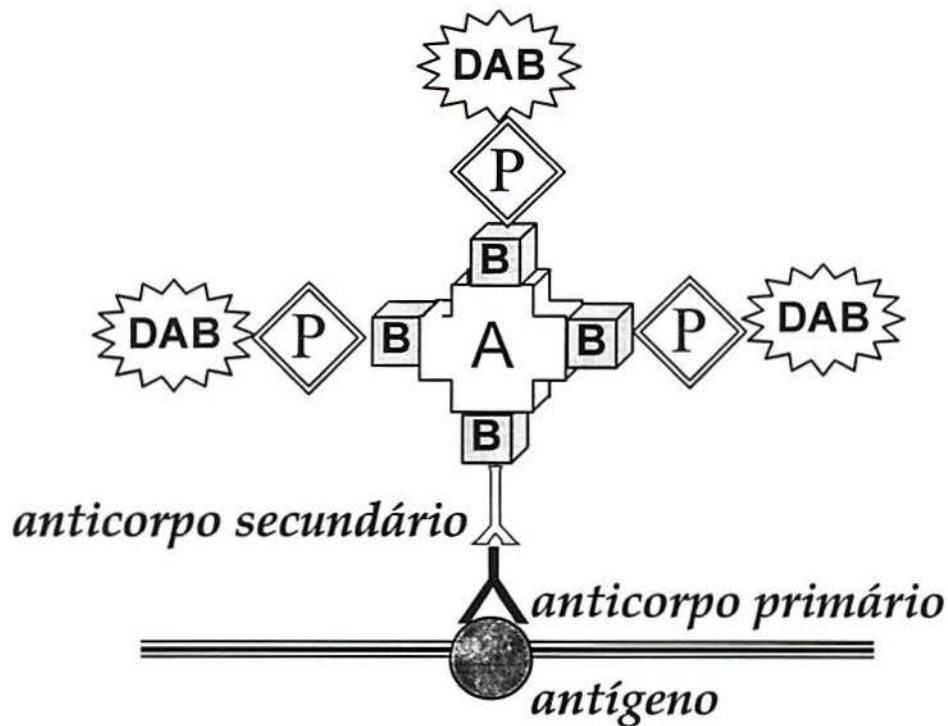


FIGURA 2-1

Representação esquemática do princípio da imuno-histoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase. Observa-se o efeito amplificador da avidina (A) que se liga à biotina (B) do anticorpo secundário e a outras três moléculas de biotina. A peroxidase (P) reage com a 3,3'-diaminobenzidina (DAB) corando os sítios antigênicos.

A quinta etapa foi a incubação dos cortes com o anticorpo primário, específico para o antígeno pesquisado. O anticorpo foi diluído em PBS numa proporção variável, ajustada para cada protocolo. Nesta etapa os cortes foram cobertos com aproximadamente 50 µl da solução do anticorpo. Para que não

houvesse evaporação e ressecamento dos cortes, esta incubação – cuja duração e temperatura também exigiram ajuste prévio – foi feita com as lâminas dispostas numa câmara úmida. A que utilizamos consiste em uma caixa plástica retangular rasa, forrada com espuma umedecida em água destilada.

Findo o tempo de incubação com o anticorpo primário, removia-se o excedente mergulhando as lâminas em PBS por 10 min e passava-se à sexta etapa, a incubação com o anticorpo secundário. Utilizamos os anticorpos biotinilados anti-IgG de coelho, camundongo, ovelha e cabra, fornecidos nos *kits* Vectastain® (Vector Laboratories, Burlingame CA, EUA). Diluiu-se o anticorpo secundário em PBS na proporção de 1:200 e aplicaram-se 50 µl da solução sobre os cortes, que permaneceram à temperatura ambiente por 30 min .

Terminada a incubação e removido o excedente de anticorpo secundário ao longo de 10 min em PBS, passamos à sétima etapa que foi a incubação dos cortes por 60 min com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain®). As soluções de estoque de avidina (solução A) e biotina + peroxidase (solução B) foram associadas e diluídas em PBS (1:200 cada) cerca de 30 min antes da incubação.

Finalmente, após nova incubação de 10 min em PBS, os cortes foram corados por uma solução de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma Chem. Co., St. Louis MO, USA) preparada minutos antes e mantida ao abrigo da luz. Uma alíquota da solução de estoque de DAB (5 mg/ml) era diluída na proporção 1:5 em PBS e acrescida de 10 µl de peróxido de hidrogênio para cada ml de solução final. Os cortes foram cobertos com 50 µl da solução de DAB por 3 min e imediatamente imersos em água destilada para remover o excedente do corante.

Concluída a imunocoloração, os cortes foram submetidos a uma discreta contra-coloração com hematoxilina, e desidratados em concentrações crescentes de etanol, variando de 70 a 99%, sendo finalmente imersos em xilol e montados com lamínula e bálsamo.

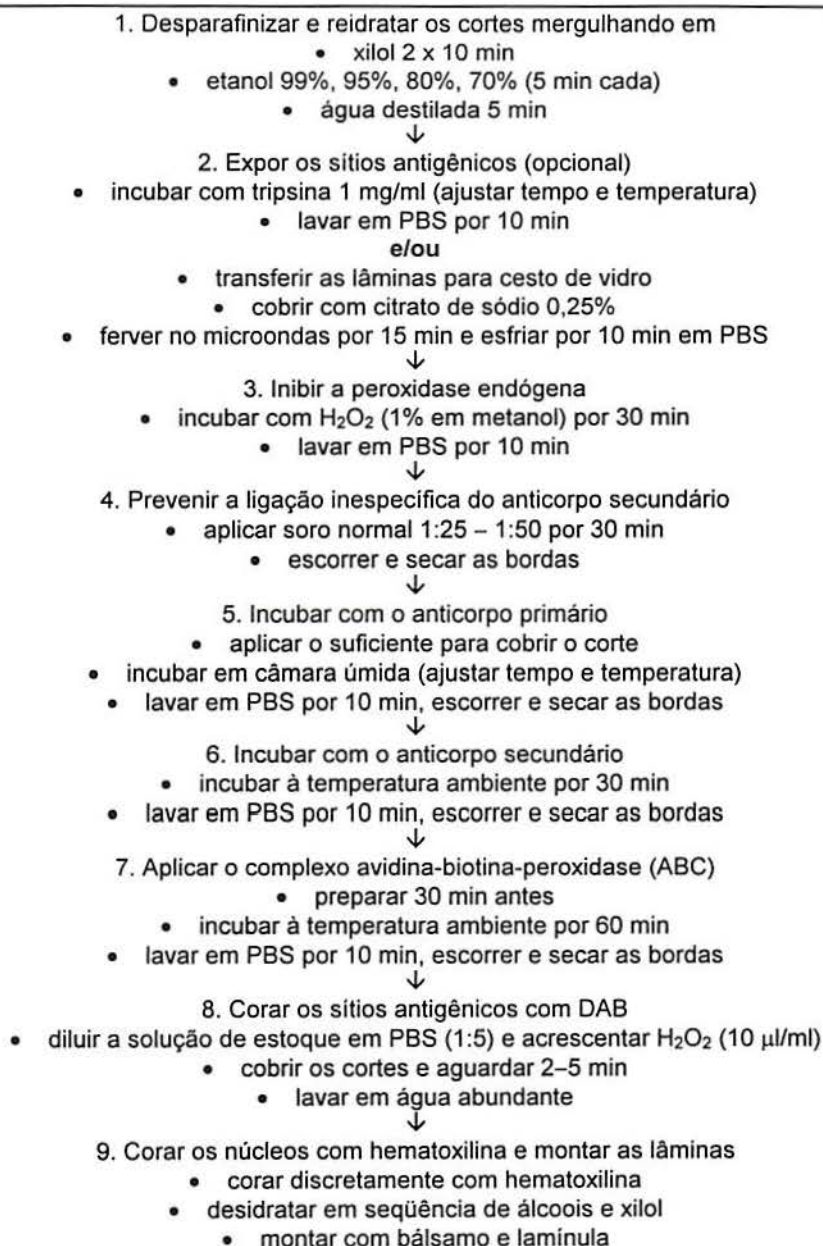


FIGURA 2-2

Fluxograma do protocolo básico de imuno-histoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase. As particularidades do método referentes a cada antígeno estudado são apresentadas na tabela 2-2.

Coloração para PRL

O anticorpo policlonal anti-PRL humana, produzido em coelho, foi gentilmente doado pelo *National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases* (NIDDK, Rockville MD, USA) na forma de soro integral liofilizado. Uma curva de diluição utilizando cortes de placenta como controle positivo permitiu rastrear a menor concentração de anticorpo capaz de produzir uma imunocoloração específica no sinciciotrofoblasto, ou seja: coloração acastanhada concentrada no citoplasma, acompanhando o contorno celular e distribuída pelo tecido de forma heterogênea, sugerindo que a intensidade ou a abrangência da coloração seriam diretamente proporcionais à concentração do antígeno específico – no caso, a PRL. Esta concentração foi 1:3000 na placenta a termo. Por isso, optou-se pela concentração de 1:2000 nas amostras de endométrio, cuja expressão de PRL seria provavelmente menor ¹⁷².

O anticorpo primário foi incubado a 4°C durante 18 horas. Como controle negativo, cortes de placenta e de endométrio de cada grupo experimental foram simultaneamente incubados com soro de coelho normal a 1:2000. O anticorpo biotilado anti-IgG de coelho (produzido em caprino) diluído a 1:200 foi aplicado durante 30 min à temperatura ambiente. Não houve necessidade de tripsinização prévia das lâminas (Tab. 2-2).

TABELA 2-2

Particularidades dos protocolos de imuno-histoquímica adotados para os diferentes antígenos em estudo.

Antígeno	Exposição dos Sítios Antigênicos	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário
Prolactina	não realizada	<ul style="list-style-type: none"> • soro de coelho anti-PRL humana • 1:2000, 4°C, 18 h 	<ul style="list-style-type: none"> • anti-IgG de coelho feito em caprino • 1:200, TA, 30 min
<i>c-fos</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tripsina 0,1% • TA, 45 min 	<ul style="list-style-type: none"> • IgG de ovelha anti-proteína <i>fos</i> humana • 20 µg/ml, TA, 24 h 	<ul style="list-style-type: none"> • anti-IgG de ovelha feito em coelho • 1:200, TA, 30 min
TGFβ1	não realizada	<ul style="list-style-type: none"> • IgG de camundongo anti-TGFβ1 humano • 5 µg/ml, 4°C, 18 h 	<ul style="list-style-type: none"> • anti-IgG de camundongo feito em caprino • 1:200, TA, 30 min
TGFβ3	<ul style="list-style-type: none"> • Tripsina 0,1% • 37°C, 30 min 	<ul style="list-style-type: none"> • IgG de caprino anti-TGFβ3 humano • 10 µg/ml, 4°C, 18 h 	<ul style="list-style-type: none"> • anti-IgG de caprino feito em coelho • 1:200, TA, 30 min

TA = temperatura ambiente

Coloração para *c-fos*

Por se tratar de uma proteína nuclear, a exposição dos sítios antigênicos de *c-fos* exigiu uma incubação dos cortes com tripsina bovina durante 30 min logo após a reidratação (Tab. 2-2). O anticorpo policlonal anti-proteína *fos* humana foi produzido em ovelha pela Serotec Ltd. (Oxford, UK). Uma curva de diluição utilizando cortes de endométrio proliferativo como controle positivo indicou a concentração 10 µg/ml como a menor capaz de produzir coloração nuclear específica. Com base neste achado, as amostras em estudo foram incubadas com o anticorpo primário na concentração de 20 µg/ml durante 24 horas à temperatura ambiente. Como controle negativo, cortes de endométrio de cada grupo experimental foram simultaneamente incubados com soro normal de ovelha a 1:50. A imunoglobulina biotinilada anti-IgG de ovelha (produzida em coelho) foi utilizada a 1:200 durante 30 min à temperatura ambiente. Para aumentar a sensibilidade do método, o complexo avidina-biotina-peroxidase utilizado para a proteína *fos* foi o conjugado ExtrAvidin® (Sigma Chem. Co., St. Louis MO, USA), que é parcialmente composto de uma avidina purificada de *Streptomyces avidinii*. A diluição (1:200) e as condições de incubação (60 min à temperatura ambiente) não diferiram dos outros protocolos.

Coloração para TGFβ1

O anticorpo policlonal anti-TGFβ1 humano (Serotec Ltd., Oxford, UK) foi produzido em camundongo. Com base na curva de diluição utilizando cortes de placenta como controle positivo, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário na concentração de 5 µg/ml durante 18 horas, à temperatura de 4°C. O controle negativo consistiu em cortes de placenta incubados com soro de camundongo não imunizado. O anticorpo biotinilado anti-IgG de camundongo (produzido em caprino) foi diluído a 1:200 e incubado durante 30 min à temperatura ambiente. Não houve necessidade de tripsinização prévia das lâminas.

Coloração para TGFβ3

Os cortes histológicos foram incubados com solução de tripsina a 37°C por 30 min para melhorar a exposição dos sítios antigênicos. O anticorpo policlonal anti-TGFβ3 humano, produzido em caprino pela R & D Systems (Minneapolis MN, USA), foi aplicado sobre os cortes na concentração de 10 µg/ml e mantido à temperatura de 4°C por 18 horas. Os controles negativos foram cortes de endométrio incubados com soro de cabra não imunizada. O anticorpo biotilado anti-IgG de cabra (produzido em coelho) foi diluído a 1:200 e aplicado por 30 min à temperatura ambiente.

Leitura das Lâminas

As lâminas foram examinadas com aumento de 200x, sempre ao mesmo microscópio e com a mesma intensidade de luz. Os resultados foram computados separadamente para o epitélio glandular e o estroma. A imunocoloração para PRL foi classificada em ausente ou presente. Nas lâminas coradas para TGFβ1 e TGFβ3 foi possível distinguir entre coloração ausente, fraca, moderada ou intensa. A coloração nuclear para *c-fos* permitiu distinguir células positivas e negativas, classificando as amostras em imunocoloração ausente/rara ou freqüente. Os controles negativos foram utilizados para revelar a coloração inespecífica, que foi desconsiderada. Para aumentar a objetividade, a leitura das lâminas foi feita sem conhecimento prévio da datação endometrial ou do tratamento, embora a morfologia do tecido corado por imuno-histoquímica permitisse uma distinção instantânea entre endométrio proliferativo e secretor.

Análise Estatística

Foram elaboradas tabelas de contingência relacionando os grupos experimentais com a freqüência de cada padrão observado à imuno-histoquímica. A freqüência dos padrões de coloração nos três diferentes grupos

foi expressa como percentual de casos e comparada pelo qui-quadrado (χ^2) calculado pelo *log-likelihood ratio*, ou pelo teste exato de Fisher, aplicado nas tabelas 2x2. Quando as pacientes foram divididas segundo a datação endometrial em 5 padrões histológicos sucessivos, a associação linear entre a datação endometrial e os resultados da imuno-histoquímica foi testada pelo χ^2 de Mantel-Haenszel. O valor crítico de significância foi $p < 0,05$.

Dosagens Hormonais

Técnica da Quimioluminescência Automatizada

As amostras de soro foram submetidas à dosagem de PRL, estradiol e progesterona pela técnica da quimioluminescência automatizada (Imunlite®, DPC®, Los Angeles CA, USA). Trata-se de um imunoensaio de fase sólida cujo marcador é a quimioluminescência. A fase sólida é uma esfera de poliestireno que contém o anticorpo primário (policlonal de coelho para os hormônios esteróides e monoclonal para PRL). A amostra de soro é pipetada no tubo contendo a esfera de poliestireno e incubada a 37°C até que se formem complexos antígeno-anticorpo marcados com fosfatase alcalina (Fig. 2-3). Esses complexos têm características distintas quando o ensaio é competitivo simples (estradiol), competitivo com ligante intermediário (progesterona) ou imunométrico de dois sítios (PRL).

Após a incubação, os conjugados enzimáticos não ligados à esfera são removidos por uma rápida lavagem e centrifugação. A fosfatase alcalina ligada aos complexos antígeno-anticorpo hidrolisa o substrato quimioluminescente, um ester fosfatado de adamantildioxietano, gerando um produto instável e emitindo luz, que é captada e quantificada por um fotômetro. A emissão de luz pode ser diretamente (imunométrico) ou inversamente (competitivos) proporcional à concentração de hormônio nativo na esfera (Fig. 2-3).

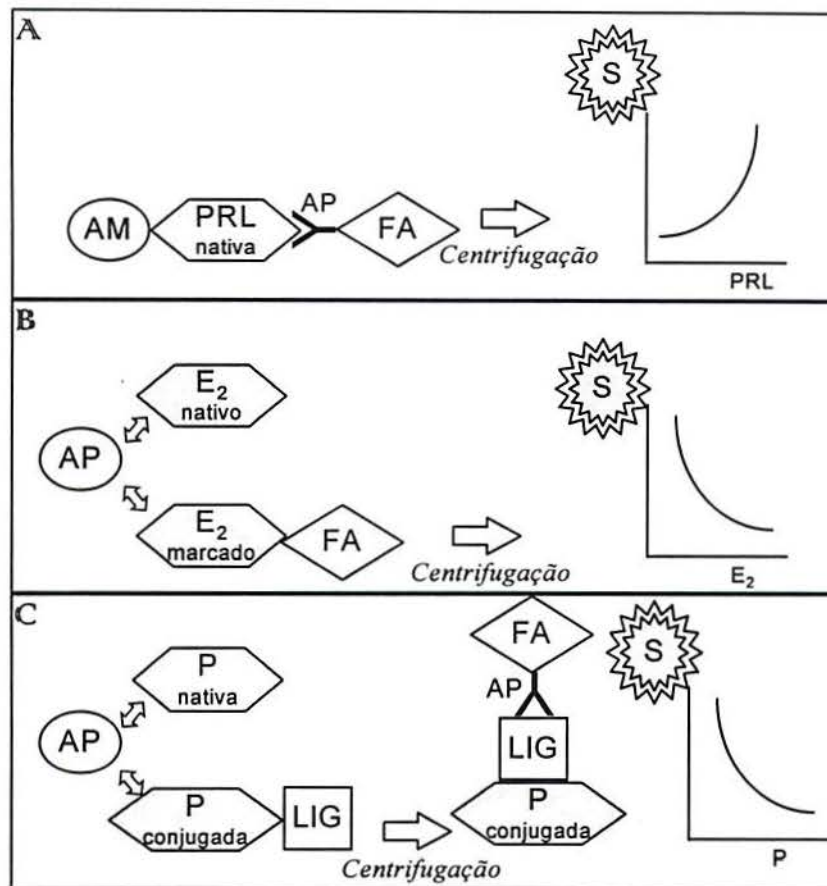


FIGURA 2-3

Representação esquemática do princípio da dosagem hormonal por quimioluminescência. No quadro superior (A) está representada a dosagem de PRL por ensaio imunométrico de dois sítios. A PRL nativa fica aderida à esfera revestida pelo anticorpo monoclonal anti-PRL humana (AM). O anticorpo secundário, policlonal, é conjugado com fosfatase alcalina (FA) e liga-se a outro sítio da PRL, formando um "sanduíche". A centrifugação remove tudo que não aderiu à esfera e a FA age sobre o substrato (S) produzindo luz, que é diretamente proporcional à concentração de PRL nativa. A dosagem de estradiol é feita por ensaio competitivo simples (quadro B). O estradiol nativo compete com estradiol marcado com FA pelos sítios de ligação do anticorpo policlonal anti-estradiol (AP) que se encontra na esfera. Após a centrifugação, a FA do hormônio retido na esfera ativa o substrato produzindo luminescência que, devido à competição, é inversamente proporcional à concentração de estradiol nativo. A dosagem de progesterona (quadro C) é também um ensaio competitivo, mas a progesterona é conjugada com um ligante não-enzimático (LIG). Após a centrifugação, adiciona-se um anticorpo policlonal marcado com FA que reconhece o ligante. Os complexos progesterona-LIG-AP-FA são incubados com o substrato e a luminosidade é inversamente proporcional à concentração de progesterona nativa.

Protocolo das Dosagens

Todas as amostras foram dosadas em duplicata e no mesmo ensaio. A curva padrão utilizada foi a mesma residente no equipamento, ajustada por padrões de concentração alta e baixa fornecidos junto com o *kit*. A tabela 2-3 resume os coeficientes de variação e os limites de detecção dos três ensaios – PRL, estradiol e progesterona. Os coeficientes de variação intra-ensaio foram obtidos a partir de 6–8 dosagens sucessivas utilizando um *pool* de soro normal. Calcularam-se a média e o desvio-padrão das replicatas e obteve-se o coeficiente de variação (CV) pela fórmula:

$$CV = \frac{\text{desvio-padrão} \times 100}{\text{média}}$$

TABELA 2-3

Coeficientes de variação intra-ensaio e limites de calibração das curvas utilizadas na dosagem sérica de PRL, estradiol e progesterona.

Hormônio	Coeficiente de Variação	Extensão da Curva
	Intra-Ensaio	Padrão
Prolactina	5,2 %	1 – 150 ng/ml
Estradiol	12,0 %	20 – 2000 pg/ml
Progesterona	5,3 %	0,2 – 40 ng/ml

Análise Estatística

As concentrações de PRL, estradiol e progesterona foram comparadas por estatística não paramétrica, uma vez que os respectivos histogramas mostraram uma distribuição irregular dos valores, incompatível com a curva normal. Os dados são expressos como mediana ± intervalo interquartil. A comparação entre grupos foi feita por análise de variância não-paramétrica de uma via (ANOVA de Kruskal-Wallis) seguida por um teste de comparações múltiplas (teste de Dunn). As diferenças com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

Avaliação da Expressão Gênica por RT-PCR

As concentrações do mRNA da PRL, *c-fos* e TGF β foram avaliadas indiretamente, pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de transcrição reversa (RT), ou simplesmente RT-PCR. O princípio desta técnica é a síntese de um DNA complementar ao mRNA (cDNA), cujos fragmentos específicos, homólogos à sequência do mRNA que codifica cada proteína em estudo, podem ser amplificados por PCR e quantificados¹²⁵.

Extração e Quantificação do RNA

As amostras de endométrio estocadas a -70°C foram trituradas por um homogeneizador elétrico Polytron em um tubo plástico estéril contendo 1 ml de solução de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol[®], Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA). A adição de clorofórmio seguida de centrifugação (10.000 rpm, 4°C , 15 min) separava a solução em uma fase aquosa e outra orgânica. A fase aquosa, que continha o RNA, era transferida para outro tubo e o RNA era precipitado com álcool isopropílico em nova centrifugação. O precipitado era então lavado por duas vezes com 1 ml de etanol 75% seguido de centrifugação curta (7.000 rpm, 4°C , 5 min)^{24,134}.

O precipitado de RNA era diluído em 20–100 μl de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e aquecido a 64°C por 10 min para desnaturação. Para a quantificação, alíquotas de 3–10 μl da solução de RNA foram diluídas em 600 μl de água tratada com DEPC e a solução resultante foi submetida a espectrofotometria nas faixas de 260 e 280 nm (GeneQuant[®], Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorbâncias a 260 e 280 nm era superior a 1,6. Considerando que uma unidade de absorbância a 260 nm corresponde a 40 μg de RNA por ml de solução, a concentração de RNA na solução original era calculada pela fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40 \mu\text{g/ml}$$

onde A = absorbância e D = diluição da alíquota usada para a quantificação. Por exemplo, para 5 μl da solução de RNA em 600 μl de água, $D = 600/5 = 120$.

Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi feita a partir de 2 µg de RNA total, utilizando oligonucleotídeos complementares à cauda poli-A do mRNA, que produzem um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do mRNA. Considerando que a fração de mRNA corresponde a aproximadamente 2–3% do RNA total, estimou-se que 2 µg de RNA total dariam origem a 40 ng de cDNA. O RNA foi inicialmente desnaturado a 70°C por 10 min juntamente com o primer. Em seguida foi incubado com a transcriptase reversa na presença de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,4 + KCl 50 mM, cloreto de magnésio 2,5 mM, mistura de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs) 0,5 mM e ditiotreitól 10 mM a 42°C durante 55 min. Após nova desnaturação a 70°C, a mistura foi incubada com RNase H de *E. coli* por 20 min a 37°C para destruir o RNA não transcrito. A reação de síntese do cDNA totalizou um volume de 20 µl que foi armazenado a –20°C até a amplificação por PCR. Todos os reagentes foram provenientes da Gibco BRL (SuperScript® Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis).

Oligonucleotídeos Específicos

Os oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para amplificação dos fragmentos de cDNA específicos para cada mRNA em estudo foram desenhados a partir da sequência publicada de cada gene, obedecendo aos seguintes critérios:

- 18 a 27 nucleotídeos;
- quando o gene possuía mais de um exon, os *primers* eram posicionados preferencialmente nas áreas de transição intron-exon para inviabilizar a amplificação acidental de DNA genômico;
- a proporção de G-C foi mantida entre 50 e 60% e equilibrada em cada par de *primers*;
- a extremidade 3' foi preferentemente ocupada por C ou G, para fortalecer a hibridização neste ponto crítico.

- a temperatura de fusão (T_m) calculada para um *primer* era semelhante à do seu par.
- evitaram-se seqüências que resultassem em complementaridade dos *primers sense e antisense*, para inibir a formação de dímeros.

A tabela 2-4 resume a localização e seqüência dos oligonucleotídeos sintetizados para este trabalho, bem como o tamanho dos fragmentos de cDNA amplificados.

Protocolo Geral da PCR

As reações de PCR foram feitas num volume final de 50 μ l seguindo uma adaptação do protocolo sugerido pela Gibco BRL. As amostras de cDNA (2 μ l, correspondentes a 4 ng de cDNA) foram inicialmente desnaturadas a 94°C por 3 min na presença de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,4 + KCl 50 mM e cloreto de magnésio 1,5 mM. Esse procedimento, conhecido como *hot start*, tem por objetivo desnaturar estruturas secundárias que, submetidas à ação da polimerase, resultariam na amplificação de fragmentos indesejados.

Em seguida os tubos eram imersos em gelo e recebiam 10 μ l de uma solução com as mesmas concentrações de tampão e $MgCl_2$, acrescida dos *primers sense e antisense*, da mistura de dNTPs e da enzima Taq DNA Polimerase (recombinante, Gibco BRL, código 10342-053). Os volumes e as concentrações finais dos reagentes utilizados na PCR estão relacionados na tabela 2-5.

TABELA 2-4

Características dos primers sintetizados para a amplificação de fragmentos específicos de cDNA.

Gene	Nucleotídeos	Seqüência Sintetizada	Fragmento	Ref.
PRL				
sense	— ^(a)	5' CCAAGGCCATCAACAGCTGC 3'	423 pb	160
antisense	— ^(a)	5' GATTCGGCACTTCAGGAG 3'		
c-fos				
sense	220–237	5' AGCTCTGCTTCACAGCGC 3'	425 pb	165
antisense	1378–1396	5' GGCCTCCTGTCATGGTCTT 3'		
TGFβ1				
sense	1213–1232	5' CAAGCAGAGTACACACAGCA 3'	443 pb	30
antisense	1636–1655	5' GATGCTGGGCCCTCTCCAGC 3'		
TGFβ2 ^(b)				
sense	604–627	5' TCCAAAGATTTAACATCTCCAACC 3'	310 pb	94
antisense	890–913	5' TCCCACTGTTTTTTTTCCTAGTGG 3'		
TGFβ3				
sense	660–680	5' GCTTCAATGTGTCCTCAGTGG 3'	323 pb	156
antisense	961–982	5' TTCCAGGATATCTCCATTGGGC3'		
β ₂ MG				
sense	943–1356	5' ATCCAGCGTACTCCAAAGATTTCAG 3'	623 pb	58
antisense	3826–3850	5' AAATTGAAAGTTAACTTATGCACGC 3'		

β₂MG = beta₂-microglobulina; pb = pares de bases.

^(a) na referência original¹⁶⁰ não há numeração para os nucleotídeos, mas os primers correspondem à região que codifica os aminoácidos 52–58 (*sense*) e 188–193 (*antisense*).

^(b) dados preliminares

Tabela 2-5

Resumo do protocolo de PCR para amplificação de cDNA utilizando "hot start". Com exceção do cDNA, todos os reagentes foram reunidos inicialmente num "mix", que foi agitado suavemente e pipetado nos tubos. Cada tubo recebeu 38 µl do mix inicial e 10 µl do mix "pós hot start", que continha a Taq polimerase.

	Mix Inicial	Pós-Hot Start	Vol. Final	Conc. Final
Água	32,8 µl	3,45 µl	36,25 µl	–
Tampão 10x	4 µl	1 µl	5 µl	1x
MgCl ₂ 50 mM	1,2 µl	0,3 µl	1,5 µl	1,5 mM
dNTP mix (10mM cada)	–	1 µl	1 µl	0,2 mM
Primer 1 (10 µM)	–	2 µl	2 µl	0,4 µM
Primer 2 (10 µM)	–	2 µl	2 µl	0,4 µM
cDNA	2 µl	–	2 µl	1:25
Taq Polimerase (5 UI/µl)	–	0,25 µl	0,25 µl	25 mUI/µl
Pipetagem	40 µl	10 µl	50 µl	–

Os volumes se referem a cada reação de 50 µl

Programação dos Ciclos de PCR

As reações de PCR foram conduzidas numa máquina de ciclos térmicos modelo PTC-100 (MJ Research Inc., Watertown MA, USA). Adotou-se em todos os casos a temperatura de 94°C para desnaturação e de 72°C para extensão. A temperatura de hibridização (*annealing*), os tempos de cada etapa e o número de ciclos foram padronizados para cada fragmento a ser amplificado. Os protocolos utilizados neste trabalho estão resumidos na tabela 2-6. A seguir será descrito o processo de validação e padronização dos protocolos adotados.

TABELA 2-6

Programação adotada para os ciclos de PCR. Os protocolos foram ajustados a partir do modelo proposto na referência bibliográfica citada.

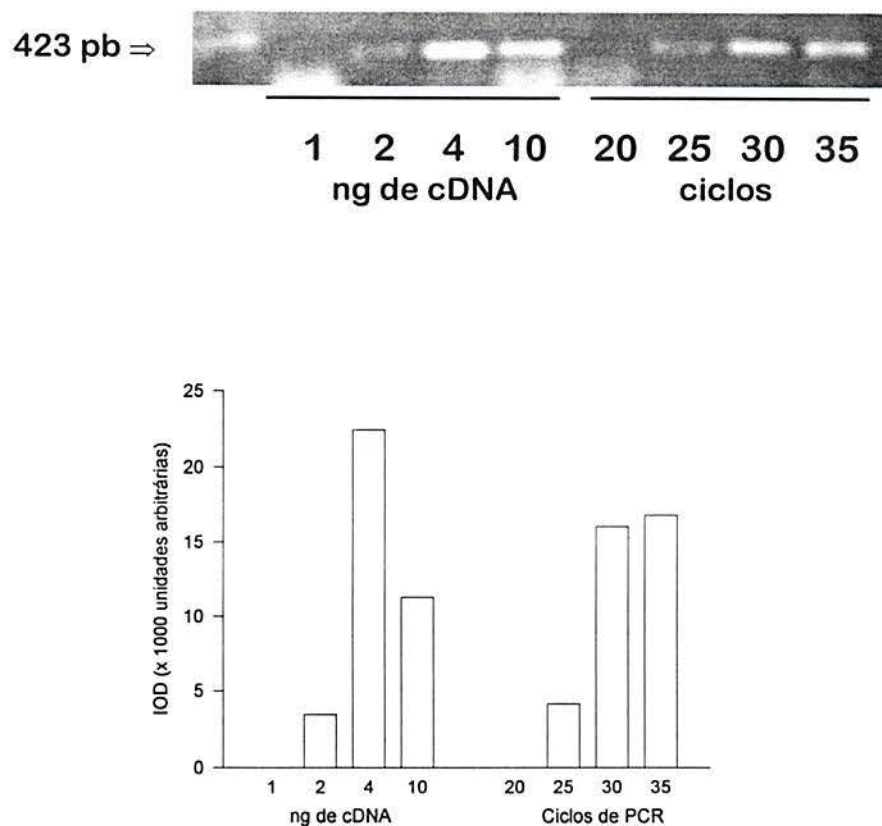
Gene	Desnaturação	Hibridização	Extensão	Ciclos	Extensão	Ref.
					Final	
PRL	94°C 30"	55°C 3 min	72°C 3 min	30	72°C 7 min	111
c-fos	94°C 30"	54°C 45"	72°C 90"	30	72°C 5 min	130
TGFβ1	94°C 90"	58°C 2 min	72°C 3 min	35	72°C 9 min	21
TGFβ2*	94°C 90"	58°C 2 min	72°C 3 min	35	72°C 9 min	21
TGFβ3	94°C 90"	58°C 2 min	72°C 3 min	35	72°C 9 min	21
β ₂ MG	94°C 1 min	55°C 1 min	72°C 1 min	30	72°C 5 min	155

*dados preliminares

Padronização da PCR para PRL

O gene da PRL humana possui 5 exons e 4 introns, o que permitiu situar os *primers sense* e *antisense* nos exons 3 e 5, respectivamente¹⁶⁰. O fragmento de cDNA amplificado possui 423 pares de bases (pb) e abrange quatro transições intron-exon, aumentando a especificidade do método.

Como mostra a figura 2-4, a quantidade mínima de cDNA para a amplificação do fragmento de 423 pb correspondente ao mRNA da PRL foi 2 ng. O produto final foi significativamente aumentado quando se partiu de 4 ng de cDNA, mas não houve ganho quando se partiu de 10 ng de cDNA. Ao contrário, o excesso de *template* pode ter inibido a ação da Taq polimerase, como adverte o próprio fabricante da enzima. O número mínimo de ciclos necessários para amplificar o fragmento desejado partindo de 4 ng de cDNA foi 30, como mostra a mesma figura. O produto obtido foi proporcional ao número de ciclos até tender à saturação, com 35 ciclos. Com base nesses achados, optamos por amplificar as amostras em 30 ciclos partindo de 4 ng de cDNA.

**FIGURA 2-4**

Padronização da PCR para determinação dos níveis de mRNA da PRL em uma placenta a termo. A curva de quantidades de cDNA foi feita com 30 ciclos de PCR e a curva de número de ciclos foi feita com 4 ng de cDNA. As barras representam a densitometria das bandas de 423 pb, expressa em unidades arbitrárias.

Padronização da PCR para c-fos

O *primer sense* foi situado numa região não traduzida do *c-fos* humano, que precede o primeiro exon, enquanto o *primer antisense* foi localizado no segundo exon¹⁶⁵. O fragmento de cDNA amplificado possui 425 pb e inclui três áreas de transição intron-exon.

A figura 2-5 mostra que a partir de 2 ng de cDNA já foi possível detectar a expressão gênica do *c-fos*, sendo que o produto obtido foi significativamente

maior com 4 ng e atingiu um platô com 10 ng de cDNA. A número de ciclos de PCR influenciou o produto final numa proporção geométrica na faixa estudada, que variou de 25 a 35 ciclos. Com base nesses achados, optamos por amplificar as amostras em 30 ciclos partindo de 4 ng de cDNA.

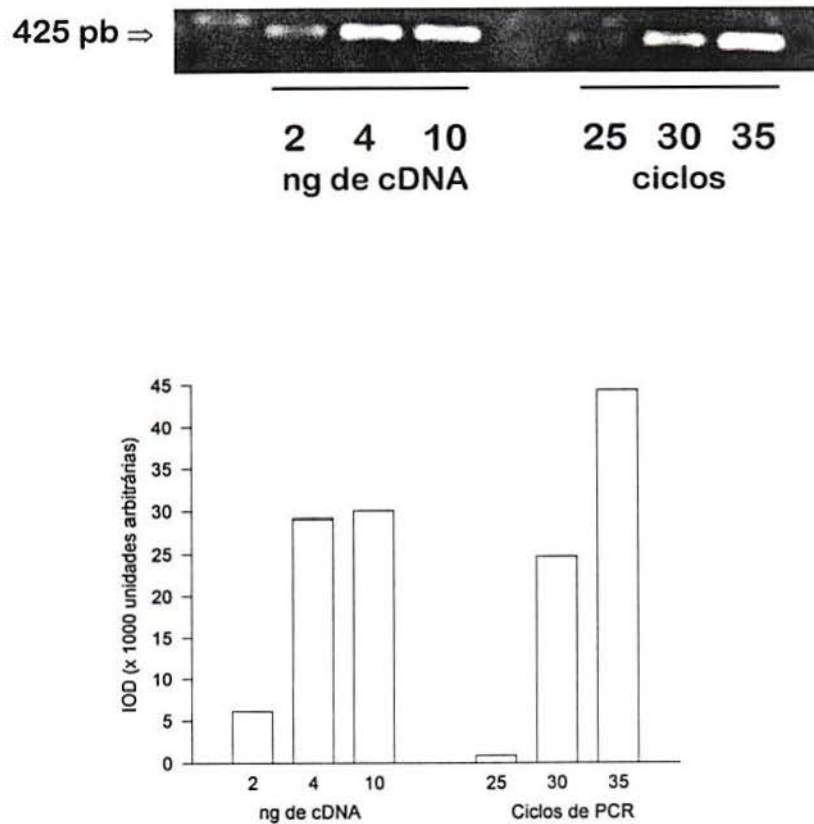


FIGURA 2-5

Padronização da PCR para determinação dos níveis de mRNA do c-fos no endométrio humano. A curva de quantidades de cDNA foi feita com 30 ciclos de PCR e a curva de número de ciclos foi feita com 4 ng de cDNA. As barras representam a densitometria das bandas de 425 pb, expressa em unidades arbitrárias.

Padronização da PCR para TGFβ1

Os *primers* foram desenhados para amplificar um fragmento de 443 pb localizado anteriormente à região codificadora do peptídeo maduro, no único exon do gene do TGFβ1 humano ³⁰.

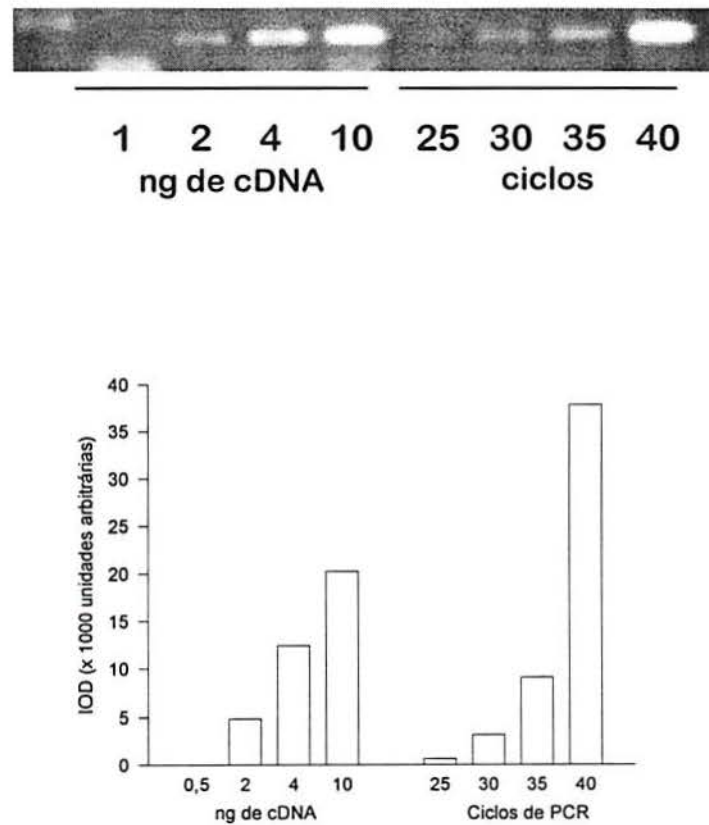
A figura 2-6 mostra que a quantidade mínima de cDNA necessária para a amplificação do fragmento desejado foram 2 ng, havendo um incremento gradual no produto amplificado a partir de 4 e 10 ng, sucessivamente. No intervalo de 25 a 40 ciclos de PCR obteve-se um resultado diretamente proporcional ao número de ciclos utilizados.

Com base nesses achados, optamos por amplificar as amostras em 35 ciclos partindo de 4 ng de cDNA.

Padronização da PCR para TGFβ2 (dados preliminares)

Os *primers* delimitam um fragmento de 310 pb localizado anteriormente à região codificadora do peptídeo maduro, no único exon do gene do TGFβ2 humano ⁹⁴.

A figura 2-7 ilustra a proporção entre a quantidade de cDNA inicial e o produto da amplificação, quando se utilizaram 2, 5 ou 10 ng de cDNA. No intervalo de 30 a 40 ciclos de PCR obteve-se um resultado diretamente proporcional ao número de ciclos utilizados. Com base nesses achados, optamos por amplificar as amostras em 35 ciclos partindo de 4 ng de cDNA.

**FIGURA 2-6**

Padronização da PCR para determinação dos níveis de mRNA do TGF β 1 em uma placenta a termo. A curva de quantidades de cDNA foi feita com 35 ciclos de PCR e a curva de número de ciclos foi feita com 4 ng de cDNA. As barras representam a densitometria das bandas de 443 pb, expressa em unidades arbitrárias.

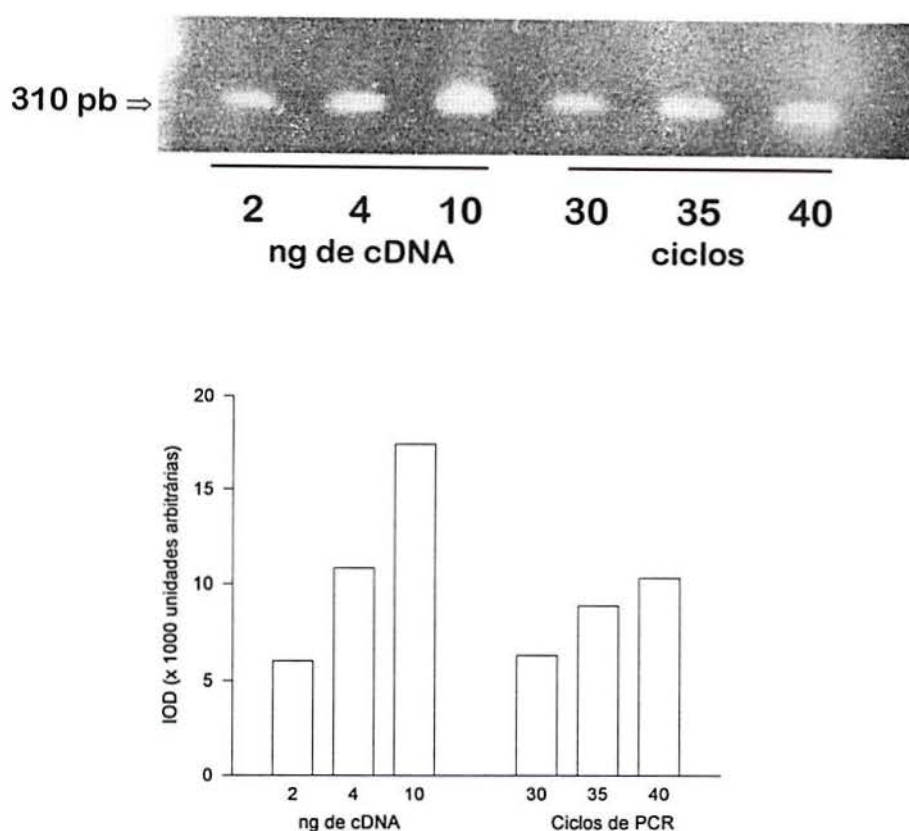


FIGURA 2-7

Padronização da PCR para determinação dos níveis de mRNA do TGFβ2 em uma placenta a termo. A curva de quantidades de cDNA foi feita com 35 ciclos de PCR e a curva de número de ciclos foi feita com 4 ng de cDNA. As barras representam a densitometria das bandas de 310 pb, expressa em unidades arbitrárias.

Padronização da PCR para TGFβ3

Os *primers* foram desenhados para amplificar um fragmento de 323 pb localizado no único exon do gene do TGFβ3 humano ¹⁵⁶.

A figura 2-8 mostra que o fragmento correspondente ao TGFβ3 pode ser amplificado a partir de apenas 1 ng de cDNA, havendo um aumento substancial do produto obtido com 4 ou 10 ng de cDNA, sucessivamente. O produto amplificado foi visível com 25 ciclos e aumentou substancialmente com 35 ciclos,

mas a partir daí não houve ganho adicional. Com base nesses achados, optamos por amplificar as amostras em 35 ciclos partindo de 4 ng de cDNA.

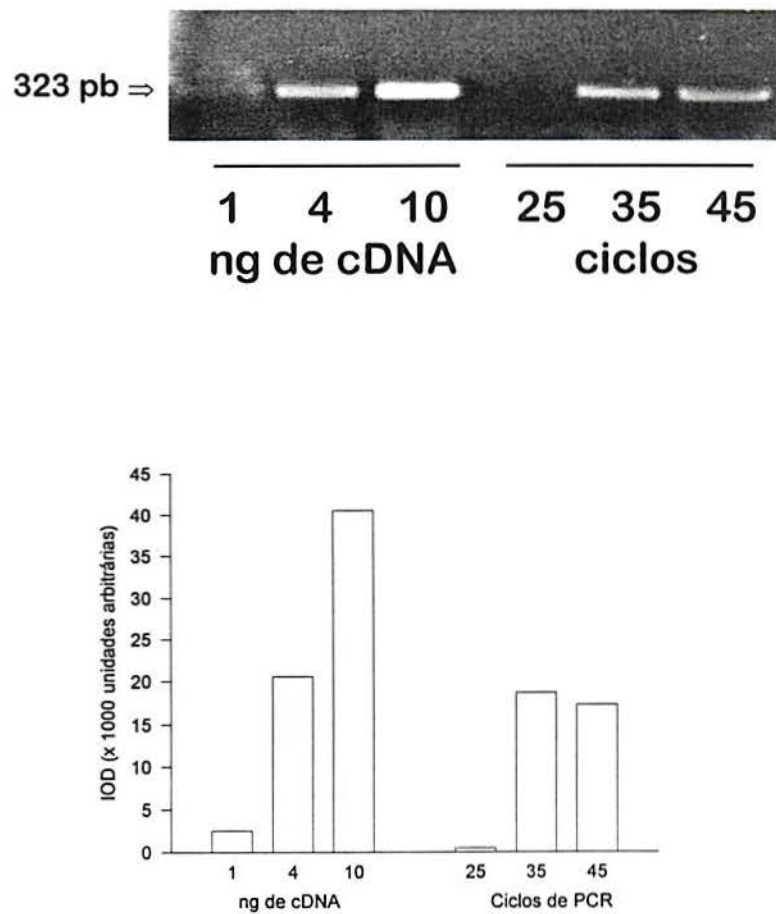


FIGURA 2-8

Padronização da PCR para determinação dos níveis de mRNA do TGF β 3 em uma placenta a termo. A curva de quantidades de cDNA foi feita com 35 ciclos de PCR e a curva de número de ciclos foi feita com 4 ng de cDNA. As barras representam a densitometria das bandas de 323 pb, expressa em unidades arbitrárias.

Padronização da PCR para β_2 -Microglobulina

Por mais precisa que seja a quantificação do RNA, se as amostras em estudo tiverem sido processadas com diferença mínima na quantidade de RNA total (e, conseqüentemente, na quantidade de cDNA) o resultado final pode ser influenciado por essa diferença de massa, distorcendo as conclusões sobre a expressão de um gene específico. Por isso, todas as amostras foram também amplificadas para β_2 -microglobulina, um gene de expressão universal que não é influenciado por estímulos hormonais¹⁵⁵.

O gene da β_2 -microglobulina possui quatro exons. O *primer sense* está situado entre o primeiro e o segundo exon, e o *primer antisense* está situado no quarto exon, delimitando um fragmento de 623 pb⁵⁸.

Na figura 2-9 observa-se que o produto da PCR, detectável já a partir de 2 ng de cDNA, aumenta consideravelmente quando se parte de 4 ng e tende ao platô quando se utilizam 10 ng de cDNA. O produto obtido também foi proporcional ao número de ciclos no intervalo de 25 a 35 ciclos.

Com base nesses achados, optamos por amplificar as amostras em 30 ciclos partindo de 4 ng de cDNA.

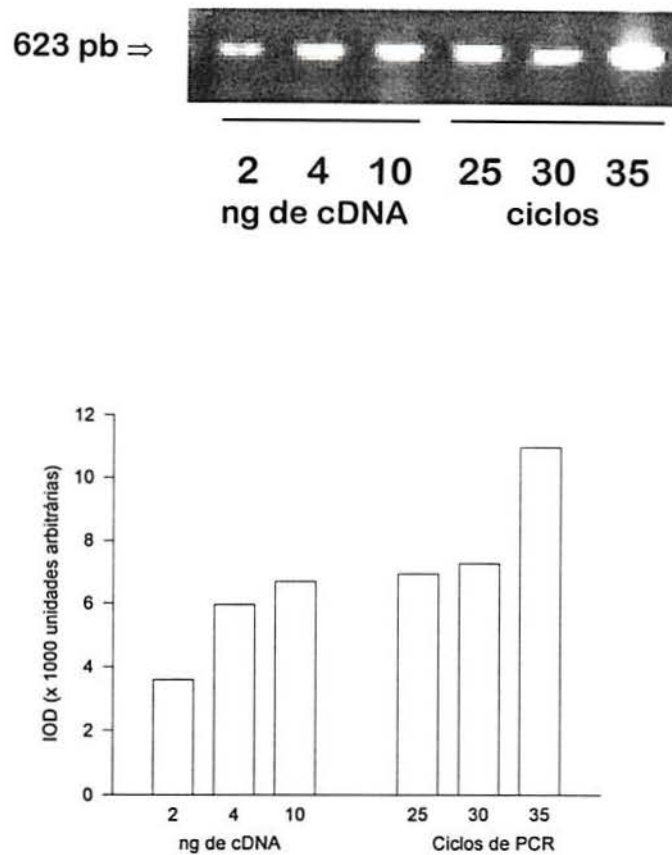


FIGURA 2-9

Padronização da PCR para determinação dos níveis de mRNA da β_2 -microglobulina em uma placenta a termo. A curva de quantidades de cDNA foi feita com 30 ciclos de PCR e a curva de número de ciclos foi feita com 4 ng de cDNA. As barras representam a densitometria das bandas de 623 pb, expressa em unidades arbitrárias.

Controles de Sensibilidade e Especificidade

A avaliação do mRNA por RT-PCR é um método semi-quantitativo altamente sensível e específico. Entretanto, alguns cuidados devem ser tomados em todos os experimentos para garantir a confiabilidade tanto dos resultados positivos quanto dos negativos. No caso dos resultados positivos, é preciso comprovar que o fragmento amplificado efetivamente corresponde à sequência gênica desejada, que a amplificação não ocorreu a partir de DNA genômico contaminante e que o resultado não foi distorcido por diferenças na quantidade inicial de cDNA introduzida na reação.

Todos esses cuidados foram tomados no presente trabalho. A especificidade dos fragmentos amplificados é atestada pela estrutura dos *primers*, cuja sequência de n nucleotídeos tem uma probabilidade insignificante ($1/4^n$) de se repetir em qualquer outro ponto do genoma, e pelo peso molecular, estimado pela posição dos marcadores na eletroforese. Na fase de síntese do cDNA, foram preparadas reações com RNA de endométrio e placenta em que se omitiu a transcriptase reversa. O produto dessas reações foi usado em lugar do cDNA para servir de controle negativo em todas as séries de PCR.

A não interferência de DNA genômico foi também assegurada pelo posicionamento dos *primers*, delimitando sempre que possível áreas de transição intron-exon. Quando os dois *primers* estavam localizados em exons diferentes, o fragmento resultante da amplificação de DNA genômico deveria ter peso molecular maior que o esperado, pois incluiria pelo menos um intron. Quando, além disso, pelo menos um *primer* pertencia simultaneamente a dois exons, sua ligação ao DNA genômico seria incompleta e a amplificação inviável. Quanto à interferência da quantidade de cDNA total introduzida na reação, procuramos corrigir todos os resultados em função da β_2 -microglobulina.

No caso dos resultados negativos, é preciso comprovar que os equipamentos e reagentes utilizados, inclusive o cDNA, estavam em boas condições. A confiabilidade dos nossos resultados negativos vem do fato de que

todas as reações de PCR em que não se obteve produto visível haviam sido feitas simultaneamente a outras em que o resultado foi positivo. Os reagentes eram os mesmos e foram preparados na forma de mix, o que exclui a possibilidade de erro de pipetagem acometendo apenas alguns tubos. O cDNA havia sido testado e havia permitido a amplificação de outros fragmentos, como o da β_2 -microglobulina. A possibilidade de falha decorrente de condições particulares do tubo de ensaio é remota porque todas as reações com resultado negativo foram repetidas e confirmadas.

Visualização e Quantificação dos Produtos de PCR

Os produtos de PCR foram fracionados por eletroforese em gel de agarose para permitir a identificação dos fragmentos amplificados¹³⁴. O gel foi preparado a 1,5% para observação de fragmentos de 400–600 pb ou a 2% para fragmentos de peso molecular inferior. A agarose foi diluída em tampão TBE (tris 0,089 M, ácido bórico 0,089 M e EDTA 0,002 M) e aquecida até o ponto de ebulição. Uma vez resfriada a solução a 50°C, acrescentou-se brometo de etídio (5 μ l de uma solução de 10 mg/ml para cada 100 ml de gel). Após a polimerização à temperatura ambiente, numa bandeja de acrílico, o gel foi alojado na cuba de eletroforese contendo tampão TBE.

Uma alíquota de 15 μ l do produto da PCR foi associada a 4 μ l do tampão de aplicação (azul de bromofenol 0,25%, xileno-cianol 0,25% e glicerol 30%) e depositada no gel. Como marcador de peso molecular, utilizou-se o DNA do fago λ digerido pela enzima de restrição *Hind*III. A eletroforese foi feita a 100 V durante 1 hora.

O gel foi visualizado e fotografado através de transiluminação por raios ultravioleta, no sistema de fotografia ImageMaster VDS[®] (Pharmacia Biotech). A imagem digitalizada foi exportada para um microcomputador e as bandas específicas foram delimitadas e quantificadas por densidade óptica, utilizando o *software* de processamento de imagens ImageMaster VDS.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como razão de unidades densitométricas, tendo como numerador a expressão do gene em estudo e como denominador a expressão de β_2 -microglobulina. O histograma dos valores densitométricos mostrou uma distribuição irregular, incompatível com a curva normal. Por isso, os dados são expressos como mediana \pm intervalo interquartil. A comparação entre grupos foi feita por ANOVA de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Dunn. Correlações entre os valores densitométricos e as dosagens hormonais foram feitas pelo coeficiente de correlação de postos de Spearman. As diferenças ou correlações com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

Resultados

Características gerais da amostra

O estudo incluiu pacientes com idades variando entre 22 e 46 anos (média \pm desvio padrão = $36,4 \pm 6,5$ anos), índice de massa corporal variando de 18,7 a $33,3 \text{ kg/m}^2$ ($24,5 \pm 3,4 \text{ kg/m}^2$), história de zero a 8 partos ($2,3 \pm 1,7$ partos) e ciclos menstruais com duração média de 21 a 37 dias ($28,5 \pm 4,1$ dias).

Das 46 pacientes randomizadas, 4 foram excluídas do estudo *a posteriori* por terem recebido MPA na fase folicular (ver fluxograma no Cap. 2), e 5 não retornaram para a biópsia de endométrio. Após a datação do endométrio, as pacientes foram reclassificadas em três grupos: endométrio proliferativo/placebo (grupo 1), endométrio secretor/placebo (grupo 2) e endométrio secretor/MPA (grupo 3). A tabela 3-1 mostra que as 37 pacientes submetidas à biópsia de endométrio e coleta de sangue ficaram assim distribuídas: grupo 1, $n=11$; grupo 2, $n=18$; grupo 3, $n=8$.

No processo de extração do RNA foram perdidas 18 das 37 das amostras, determinando que o estudo da expressão gênica fosse feito numa subamostra assim constituída: grupo 1, $n=7$; grupo 2, $n=6$; grupo 3, $n=6$. Como ilustra a figura 3-1, não houve diferença significativa entre os três grupos experimentais quanto à idade, índice de massa corporal, paridade ou duração dos ciclos menstruais, seja na amostra completa, seja na subamostra submetida a análise do mRNA.

Confirmação do uso correto do MPA

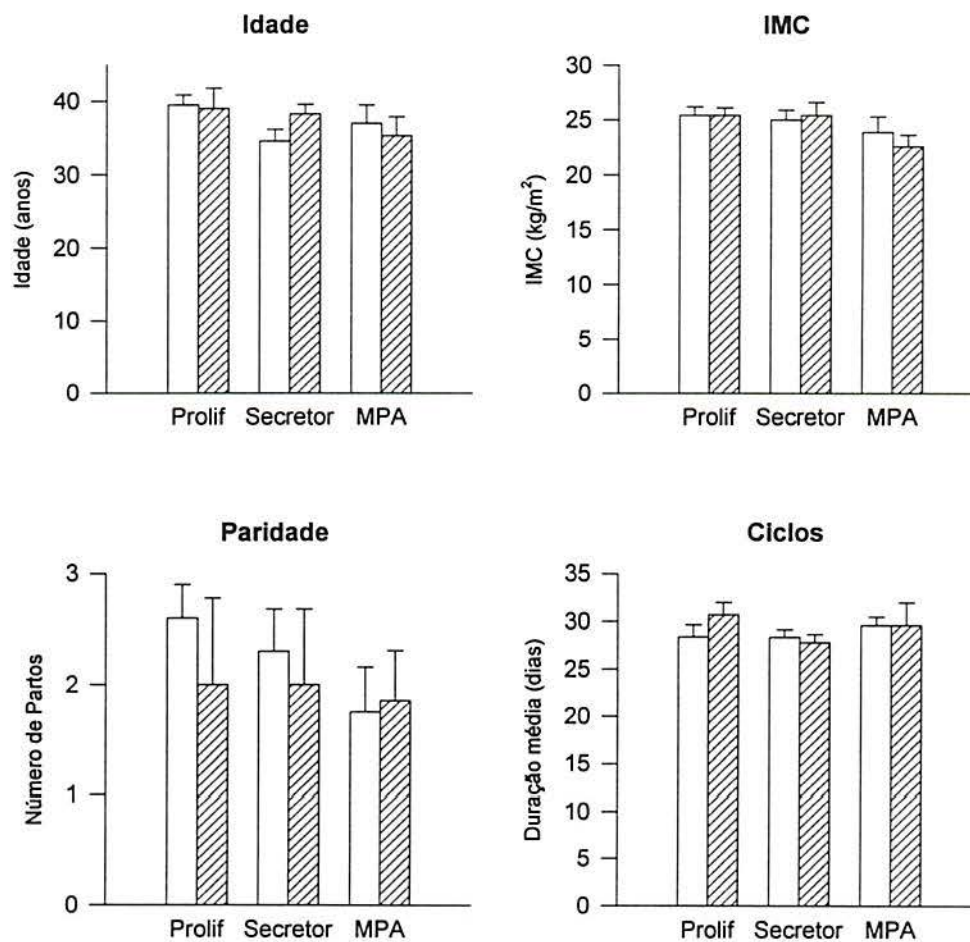
Todas as pacientes devolveram os frascos vazios e confirmaram ter usado o medicamento de acordo com a prescrição. Nenhuma paciente relatou efeitos colaterais do MPA. Todas as 8 biópsias evidenciaram endométrio secretor, sendo 4 com padrão característico da fase secretora intermediária e 4 com padrão secretor tardio. Os níveis séricos de progesterona no grupo tratado com MPA também estavam reduzidos (Fig. 3-2), indicando um possível efeito anovulatório e/ou luteolítico da droga.

TABELA 3-1

Número de pacientes randomizadas na fase folicular e na fase lútea para receber placebo ou MPA e de pacientes submetidas à biópsia de endométrio e dosagens hormonais em cada estrato. Distribuição das pacientes nos grupos 1 (proliferativo / placebo), 2 (secretor / placebo) e 3 (secretor / MPA), classificados após datação do endométrio, e número de pacientes submetidas a análise do mRNA em cada grupo.

Estrato (Tratamento)	Randomizadas	Biópsia de Endométrio	Grupo (Tratamento)	Histologia e Hormônios	Análise de mRNA
Fase Folicular (Placebo)	12	10	1. Proliferativo (Placebo)	11	7
Fase Lútea (Placebo)	20	19	2. Secretor (Placebo)	18	6
Fase Lútea (MPA)	10	8	3. Secretor (MPA)	8	6
Total*	42	37	Total	37	19

*excluídas as 4 pacientes da fase folicular/MPA

**FIGURA 3-1**

Idade, índice de massa corporal (IMC), paridade e duração média dos ciclos menstruais nos grupos Proliferativo/placebo, Secretor/placebo e Secretor/MPA. As barras representam a média \pm erro padrão da média na amostra completa (barras claras) e na subamostra submetida a análise do mRNA (barras hachuradas). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias (ANOVA).

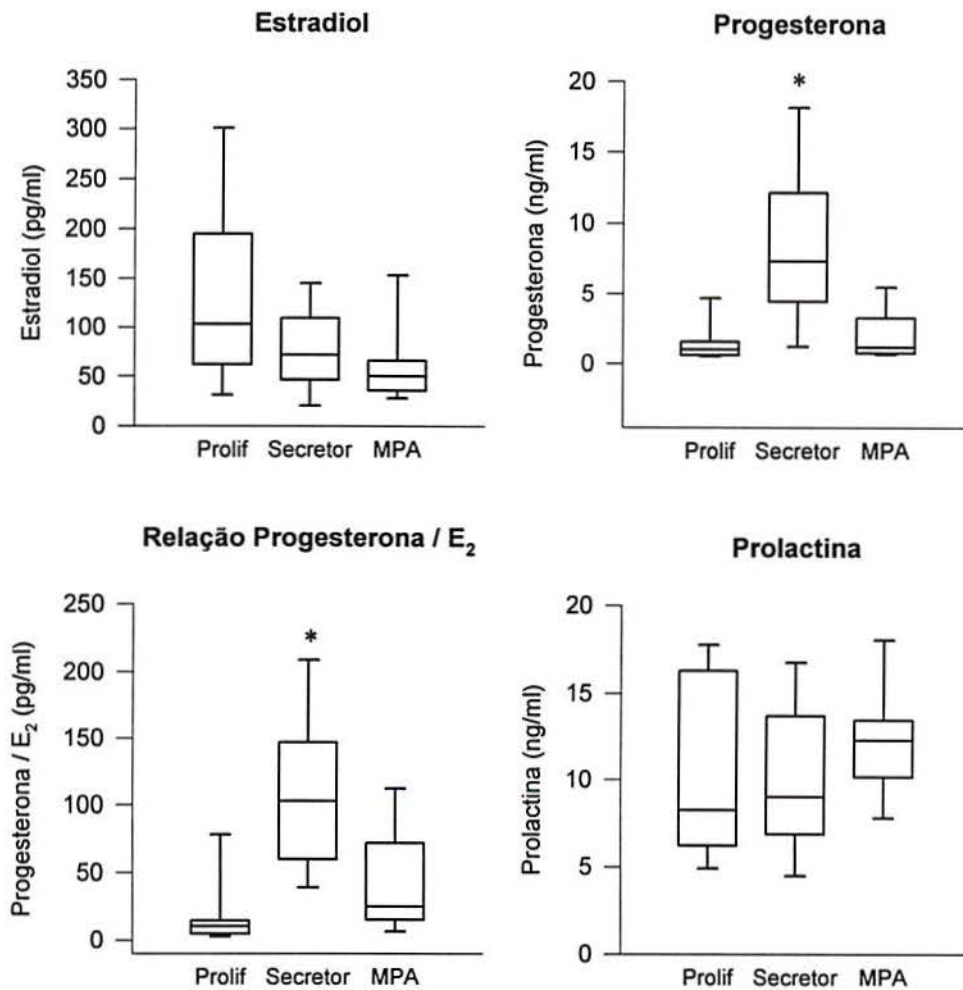


FIGURA 3-2

Níveis séricos de estradiol, progesterona e PRL nos três grupos experimentais. As colunas delimitam o intervalo interquartil, as linhas horizontais representam a mediana e as barras verticais indicam os percentis 10 e 90. * $p < 0,05$ vs grupos 1 (proliferativo) e 3 (MPA); ANOVA de Kruskal-Wallis e teste de Dunn.

Níveis séricos de estradiol, progesterona e prolactina

Como ilustra a figura 3-2, os níveis de estradiol tiveram maior dispersão e atingiram valores mais altos na fase proliferativa, mas os valores médios não foram significativamente diferentes entre os três grupos experimentais. Já as concentrações de progesterona e a relação progesterona/estradiol foram muito superiores no grupo 2 (secretor) em relação aos demais. Os níveis séricos de PRL ficaram restritos aos valores de referência para a população normal e não foram diferentes entre os três grupos estudados.

Prolactina Endometrial

PRL Imunorreativa

A expressão de PRL detectada pela imuno-histoquímica foi distribuída tanto pelo estroma quanto pelo epitélio glandular (Fig. 3-3). A proporção de pacientes que apresentaram imunocoloração para PRL no epitélio glandular foi de apenas 9,1% no grupo 1, aumentando para 55,6% no grupo 2 e 100% no grupo 3 ($p < 0,05$). No estroma endometrial, a PRL foi detectada em 9,1% das pacientes do grupo 1, 66,7% do grupo 2 e 87,5% do grupo 3 ($p < 0,01$; Fig. 3-4).

Observou-se um nítido crescimento da frequência de amostras imunopositivas para PRL no decorrer da diferenciação do endométrio (Fig. 3-5). No epitélio, esta frequência aumentou de 42,9% no endométrio secretor inicial para 100% no secretor tardio ($\chi^2 = 13,3$; gl = 1; $p = 0,0003$). No estroma, a proporção de amostras positivas para PRL aumentou de 71,4% no grupo secretor inicial para 100% no secretor tardio ($\chi^2 = 9,3$; gl = 1; $p = 0,002$). O aparecimento de PRL coincidiu com a elevação dos níveis de progesterona na fase secretora inicial, mas sua expressão continuou aumentando em paralelo com a diferenciação do endométrio mesmo após a estabilização e a queda pré-menstrual dos níveis de progesterona (Fig. 3-5).

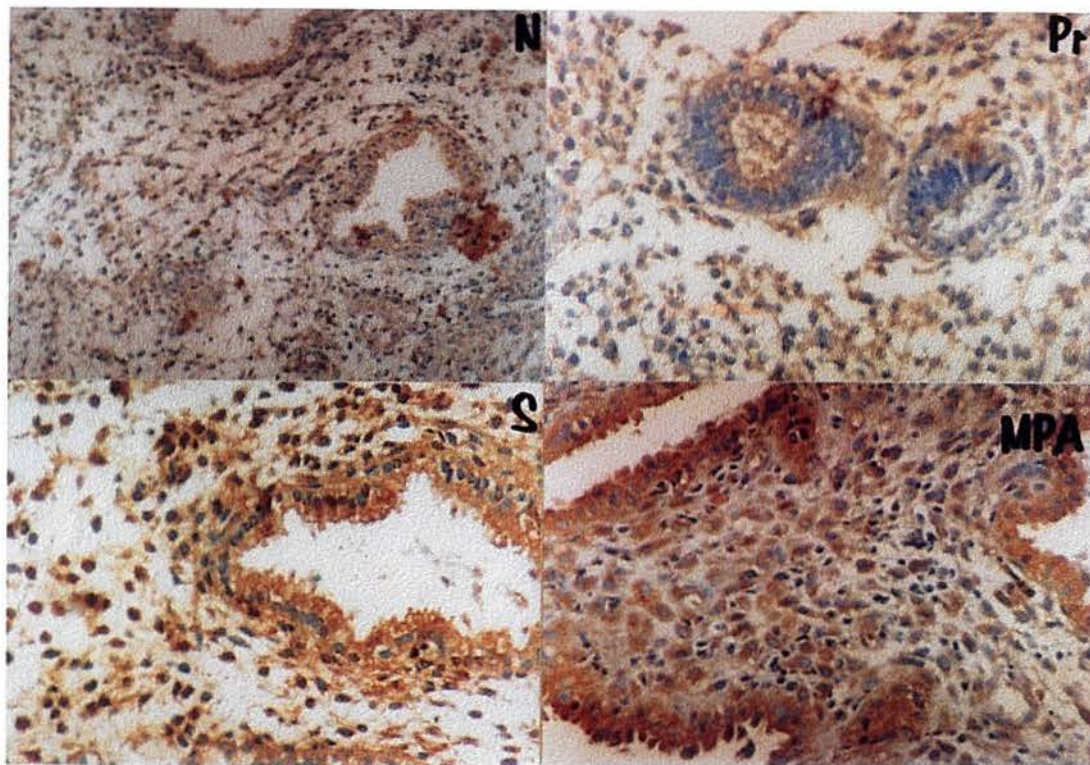


FIGURA 3-3

Fotomicrografias mostrando tecido endometrial corado por imuno-histoquímica para PRL. N = controle negativo, Pr = endométrio proliferativo/ placebo; S = endométrio secretor/ placebo; MPA = endométrio secretor/ MPA. A coloração castanha indica a presença de PRL (aumento de 400x).

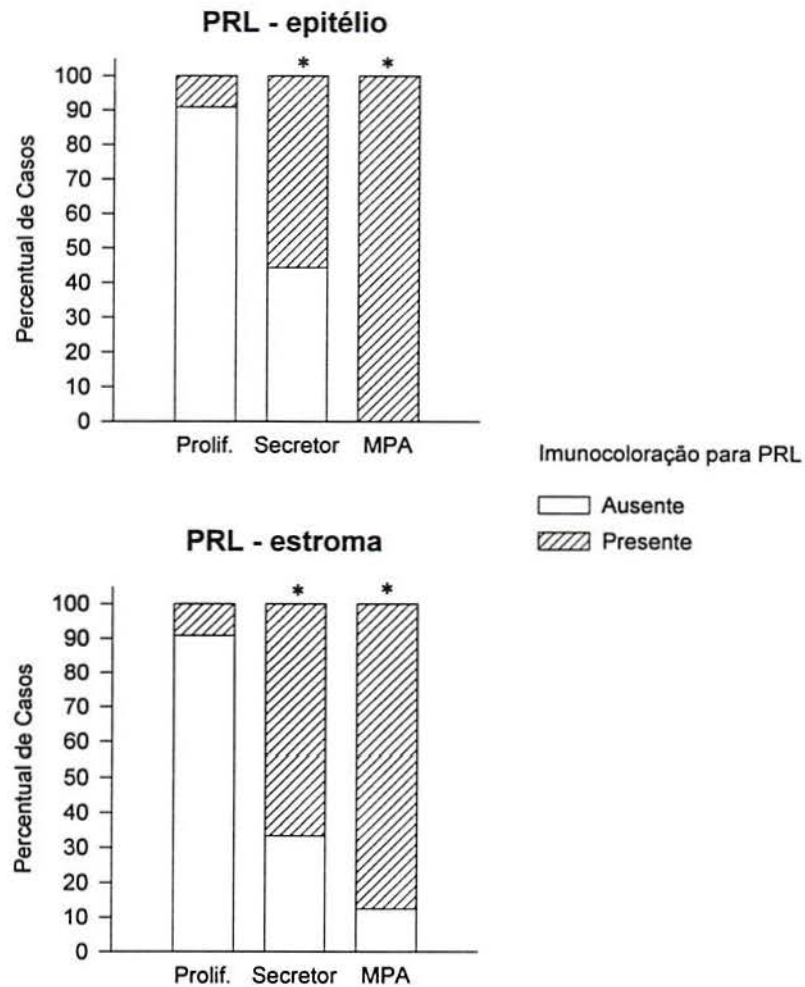
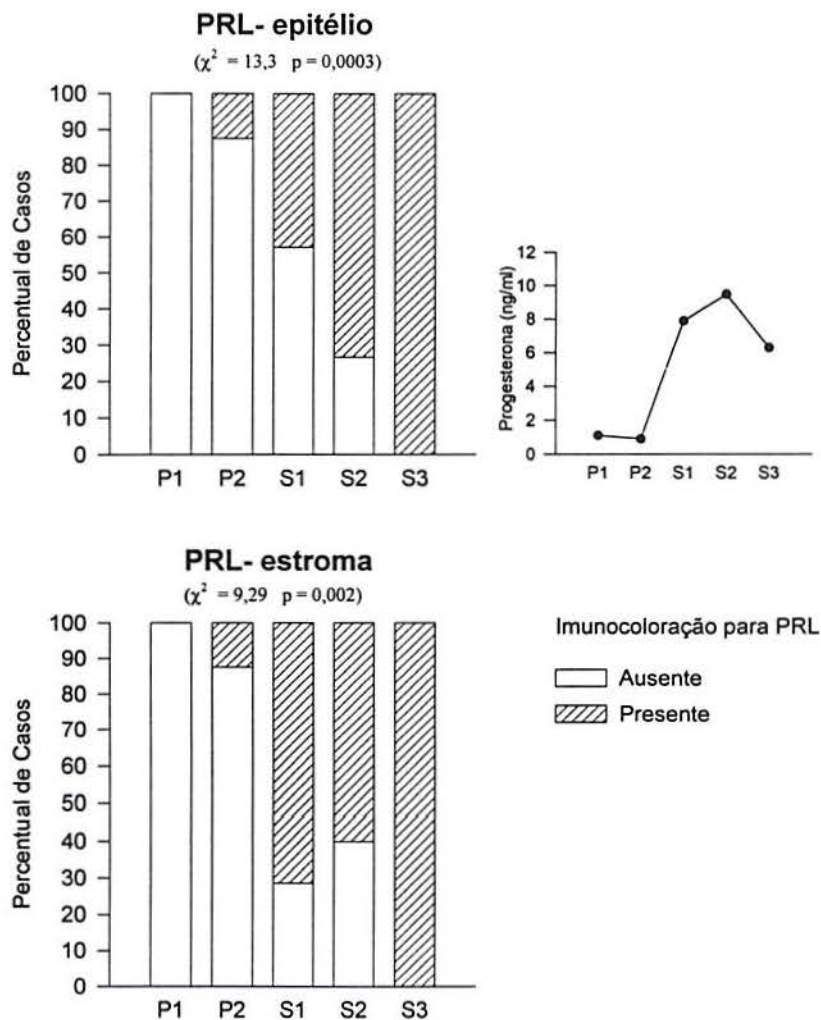


FIGURA 3-4

*Percentual de pacientes que apresentaram imunocoloração para PRL no epitélio glandular e no estroma endometrial, nos três grupos experimentais. * $p < 0,05$ vs grupo 1 (proliferativo); teste exato de Fisher.*

**FIGURA 3-5**

Percentual de pacientes que apresentaram imunocoloração para PRL no epitélio glandular e no estroma em etapas sucessivas da diferenciação endometrial. As pacientes de todos os grupos experimentais foram reagrupadas em endométrio proliferativo inicial (P1), proliferativo intermediário (P2), secretor inicial (S1), secretor intermediário (S2) e secretor tardio (S3). Os valores de χ^2 foram calculados para a associação linear entre as variáveis (teste de Mantel-Haenszel, gl = 1). Os níveis séricos de progesterona nas respectivas fases do ciclo são expressos como medianas.

mRNA da PRL no endométrio

A presença de mRNA para PRL foi detectada com baixa intensidade no endométrio proliferativo, aumentando moderadamente no endométrio secretor (placebo) e substancialmente no grupo tratado com MPA ($p < 0,05$; Fig. 3-6).

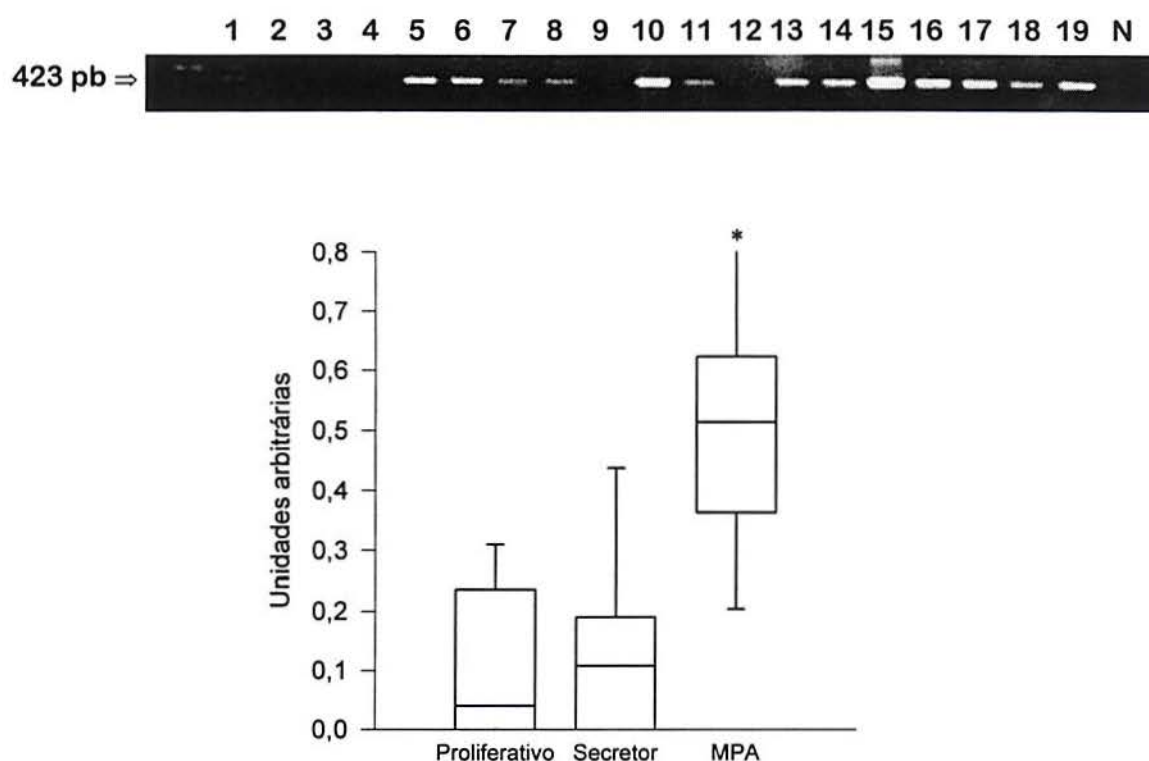


FIGURA 3-6

RT-PCR da PRL no endométrio humano. O fragmento de 423 pb, analisado em gel de agarose, corresponde ao mRNA da PRL nos grupos proliferativo (linhas 1 a 7), secretor (linhas 8 a 13) e MPA (linhas 14 a 19). N= controle negativo. A quantificação das bandas (unidades arbitrárias) foi corrigida pela expressão da β_2 -microglobulina. As colunas delimitam o intervalo interquartil, as linhas horizontais representam a mediana e as barras verticais indicam os percentis 10 e 90. * $p < 0,05$ vs grupos proliferativo e secretor (ANOVA de Kruskal-Wallis e teste de Dunn).

c-fos

Proteína fos Imunorreativa

Como ilustra a figura 3-7, a imunocoloração específica para a proteína *fos* foi observada predominantemente no estroma do endométrio proliferativo. A proporção de pacientes com predomínio de células positivas para *c-fos* no estroma endometrial foi de 54,5% no grupo 1, caindo para 7,1% no grupo 2 e 0% no grupo 3 ($p < 0,05$; Fig. 3-8).

A expressão de *c-fos* se intensificou à medida que avançava a proliferação endometrial. No início da fase proliferativa, predominaram amostras com pequena concentração focal de células positivas para *c-fos*, ao passo que na fase proliferativa intermediária predominaram as amostras repletas de células imunopositivas (Fig. 3-9). A presença de *c-fos* foi quase inteiramente suprimida no endométrio secretor, coincidindo com o aumento da relação progesterona/estradiol (Fig. 3-9).

A figura 3-10 mostra que a expressão de *c-fos* no estroma endometrial foi diretamente proporcional aos níveis séricos de estradiol ($r = 0,373$; $p = 0,033$). A relação progesterona/estradiol, excluído o grupo MPA (que tinha níveis baixos de progesterona mas estava sob o potente efeito progestínico da droga) apresentou uma correlação inversa com a expressão de *c-fos* no endométrio ($r = -0,534$; $p = 0,006$).

mRNA do c-fos no endométrio

A figura 3-11 mostra que a presença de mRNA do *c-fos* foi muito maior no endométrio proliferativo que no endométrio secretor, estando este último sob efeito de placebo ou MPA. À semelhança do que ocorreu com a proteína *fos* imunorreativa, a concentração de mRNA do *c-fos* foi diretamente proporcional aos níveis séricos de estradiol ($r = 0,560$; $p = 0,016$) e inversamente proporcional à relação progesterona/estradiol ($r = -0,560$; $p = 0,046$; Fig. 3-12).

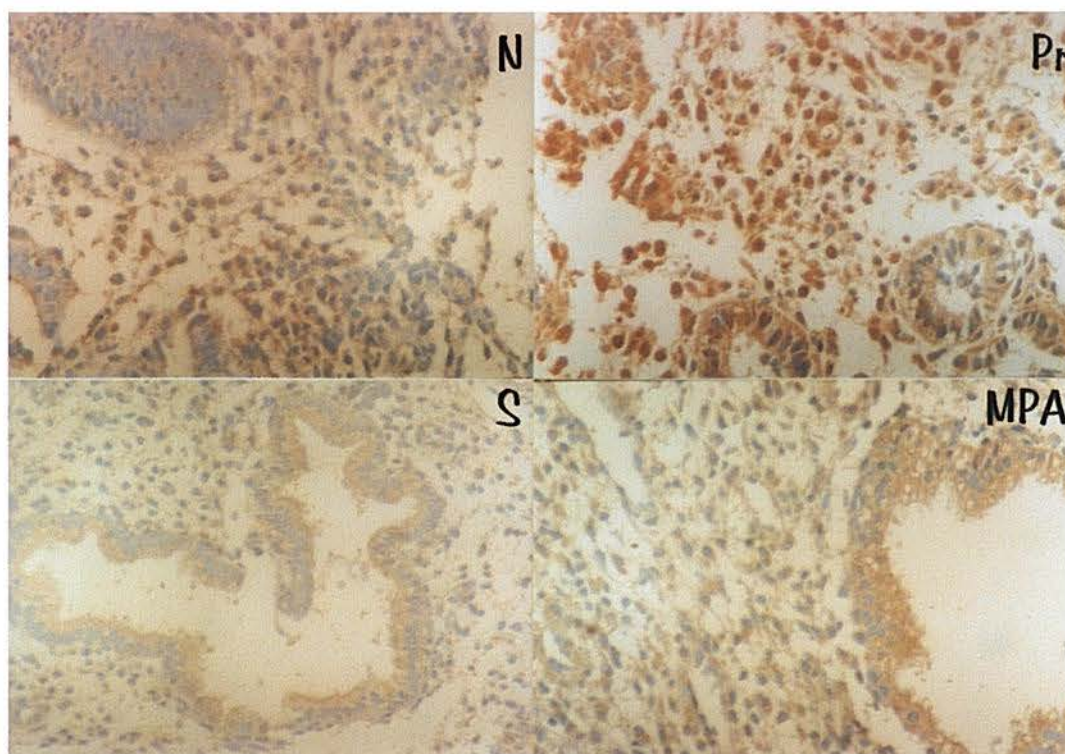


FIGURA 3-7

Fotomicrografias mostrando tecido endometrial corado por imuno-histoquímica para c-fos. N = controle negativo, Pr = endométrio proliferativo/ placebo;

S = endométrio secretor/ placebo; MPA = endométrio secretor/ MPA.

A coloração castanha nos núcleos indica a presença de c-fos (aumento de 400x).

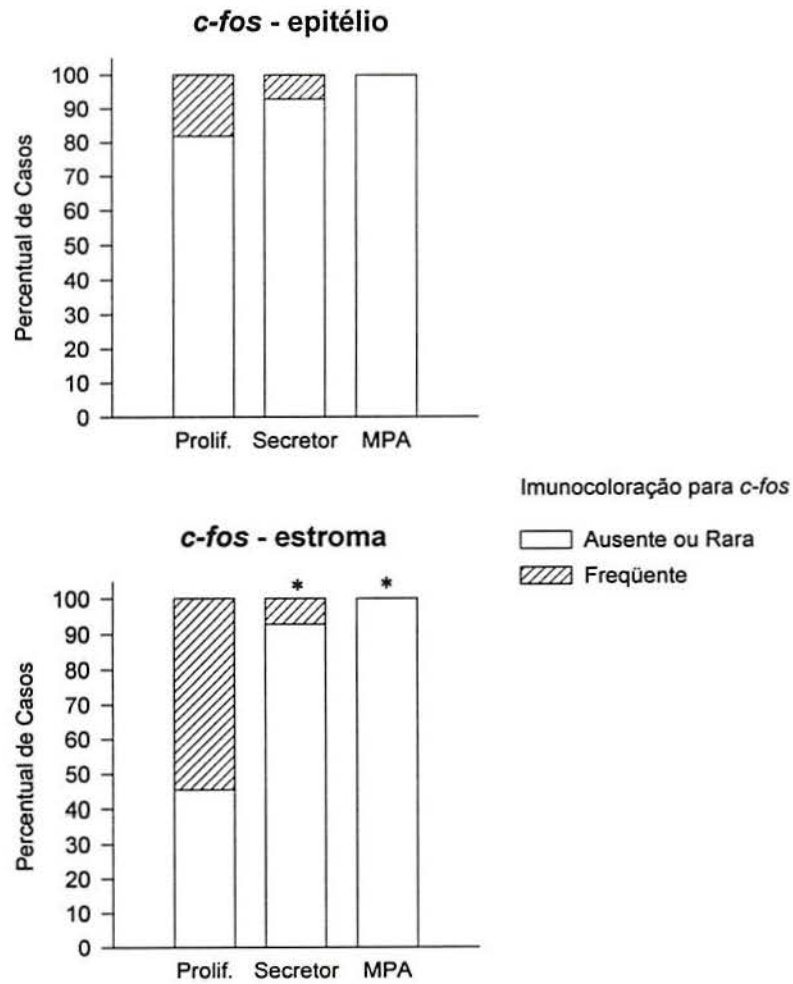
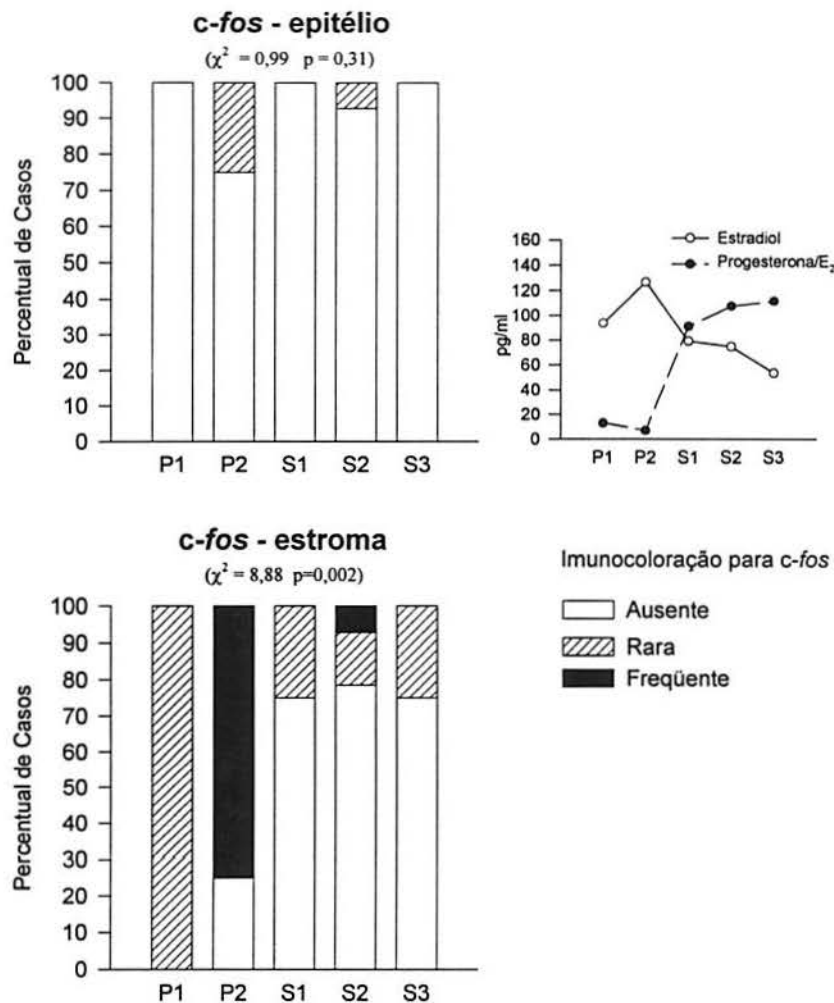
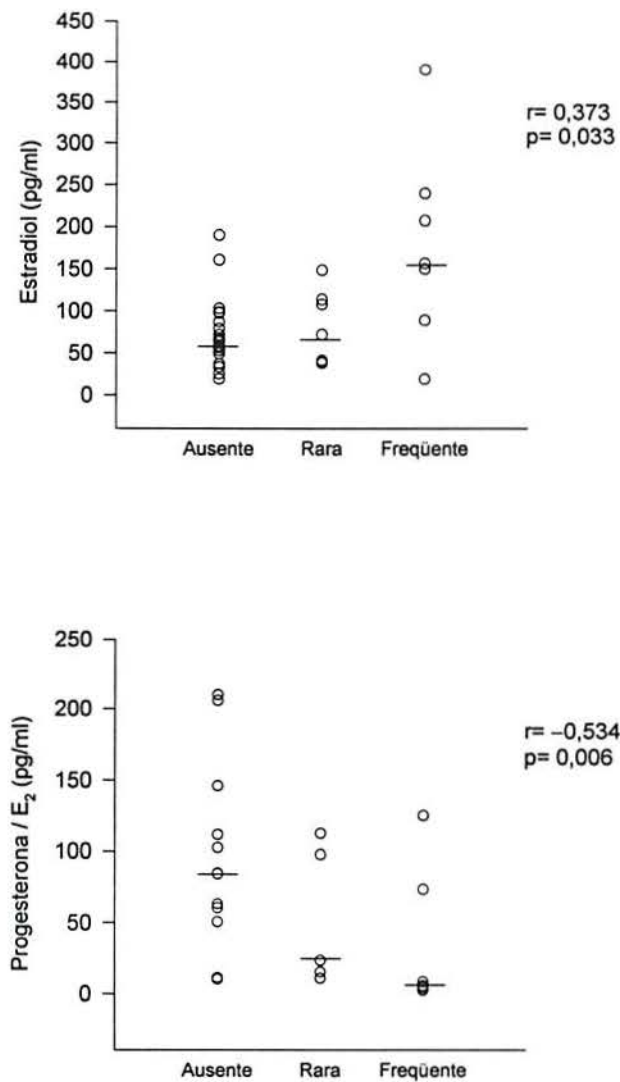


FIGURA 3-8

Percentual de pacientes que apresentaram imunocoloração para c-fos no epitélio glandular e no estroma endometrial, nos três grupos experimentais. * $p < 0,05$ vs grupo 1 (proliferativo); teste exato de Fisher.

**FIGURA 3-9**

Percentual de pacientes que apresentaram imunocoloração para c-fos no epitélio glandular e no estroma em etapas sucessivas da diferenciação endometrial. As pacientes de todos os grupos experimentais foram reagrupadas em endométrio proliferativo inicial (P1), proliferativo intermediário (P2), secretor inicial (S1), secretor intermediário (S2) e secretor tardio (S3). Os valores de χ^2 foram calculados para a associação linear entre as variáveis (teste de Mantel-Haenszel, gl = 1). Os níveis séricos de estradiol e a relação progesterona/estradiol (excluído o grupo MPA) nas respectivas fases do ciclo são expressos como medianas.

**FIGURA 3-10**

Correlação entre a imunocoloração para c-fos no endométrio (ausente, rara ou freqüente) e os níveis séricos de estradiol (nos três grupos experimentais) ou a relação progesterona/estradiol (nos grupos proliferativo e secretor/placebo). r = coeficiente de correlação de postos de Spearman. As barras horizontais indicam as medianas.

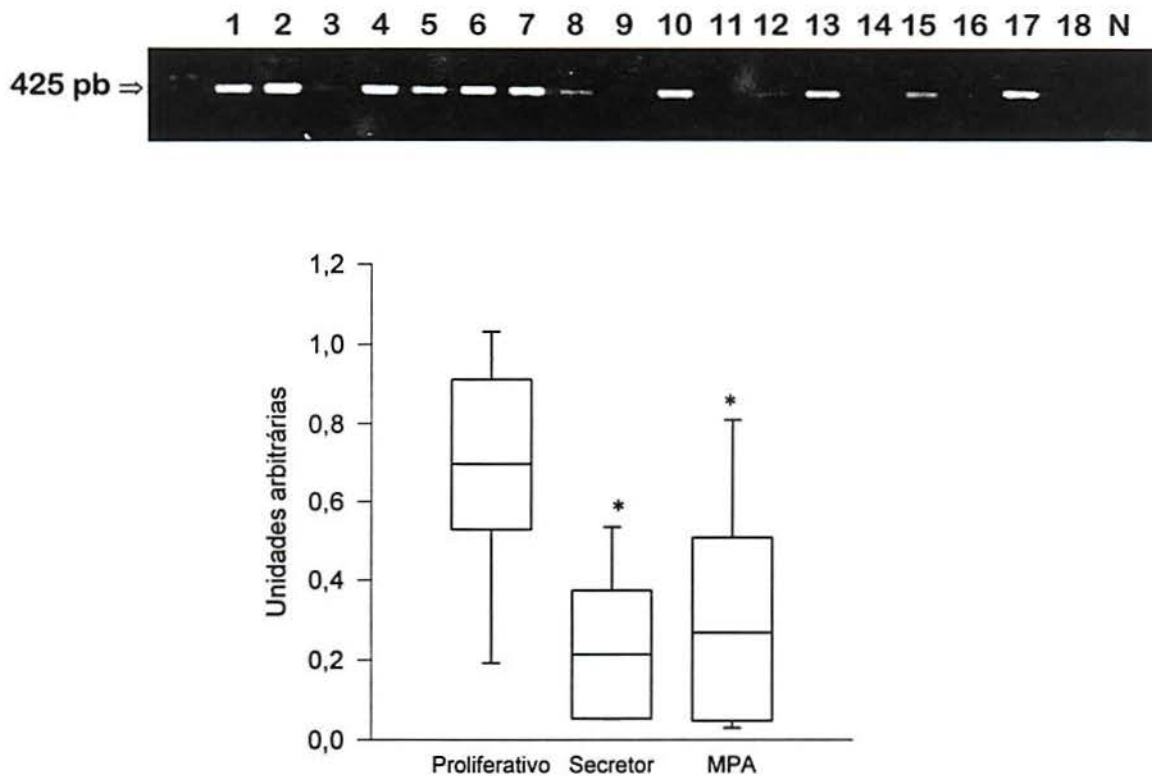
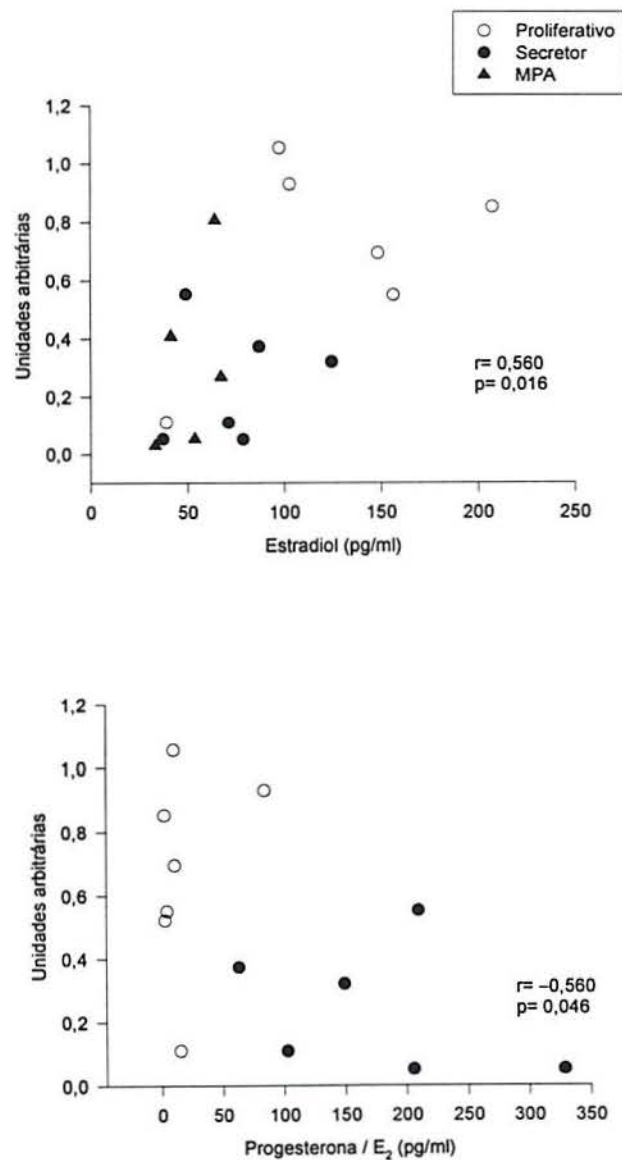


FIGURA 3-11

RT-PCR do *c-fos* no endométrio humano. O fragmento de 425 pb, analisado em gel de agarose, corresponde ao mRNA do *c-fos* nos grupos proliferativo (linhas 1 a 7), secretor (linhas 8 a 13) e MPA (linhas 14 a 18). N= controle negativo. A quantificação das bandas (unidades arbitrárias) foi corrigida pela expressão da β_2 -microglobulina. As colunas delimitam o intervalo interquartil, as linhas horizontais representam a mediana e as barras verticais indicam os percentis 10 e 90. * $p < 0,05$ vs grupo proliferativo (ANOVA de Kruskal-Wallis e teste de Dunn).

**FIGURA 3-12**

Correlação entre a concentração de mRNA para c-fos e os níveis séricos de estradiol (nos três grupos experimentais) ou a relação progesterona/estradiol (nos grupos proliferativo e secretor/placebo). r = coeficiente de correlação de postos de Spearman.

Fator de Crescimento TGF β 1

TGF β 1 imunorreativo

Como ilustra a figura 3-13, a imunocoloração para TGF β 1 predominou no estroma endometrial, mas também foi observada no epitélio glandular em 20% das amostras do grupo proliferativo e em 40% das amostras do grupo MPA (fig. 3-14). Não houve diferença significativa na expressão de TGF β 1 observada nos três grupos experimentais.

mRNA do TGF β 1 no endométrio

A concentração de mRNA para TGF β 1 apresentou grande variação individual, mas os níveis médios foram similares nos três grupos, como ilustra a figura 3-15.

Fator de Crescimento TGF β 2 (dados preliminares)

mRNA do TGF β 2 no endométrio

Como mostra a figura 3-16, houve um aumento progressivo na concentração do mRNA para TGF β 2 nos grupos 1, 2 e 3, sucessivamente. Quando comparados os grupos 1 (proliferativo) e 3 (MPA), observa-se que a concentração do mRNA para TGF β 2 foi duplicada no grupo tratado com MPA, ficando esta diferença no limiar de significância estatística ($p=0,058$; teste de Mann-Whitney).

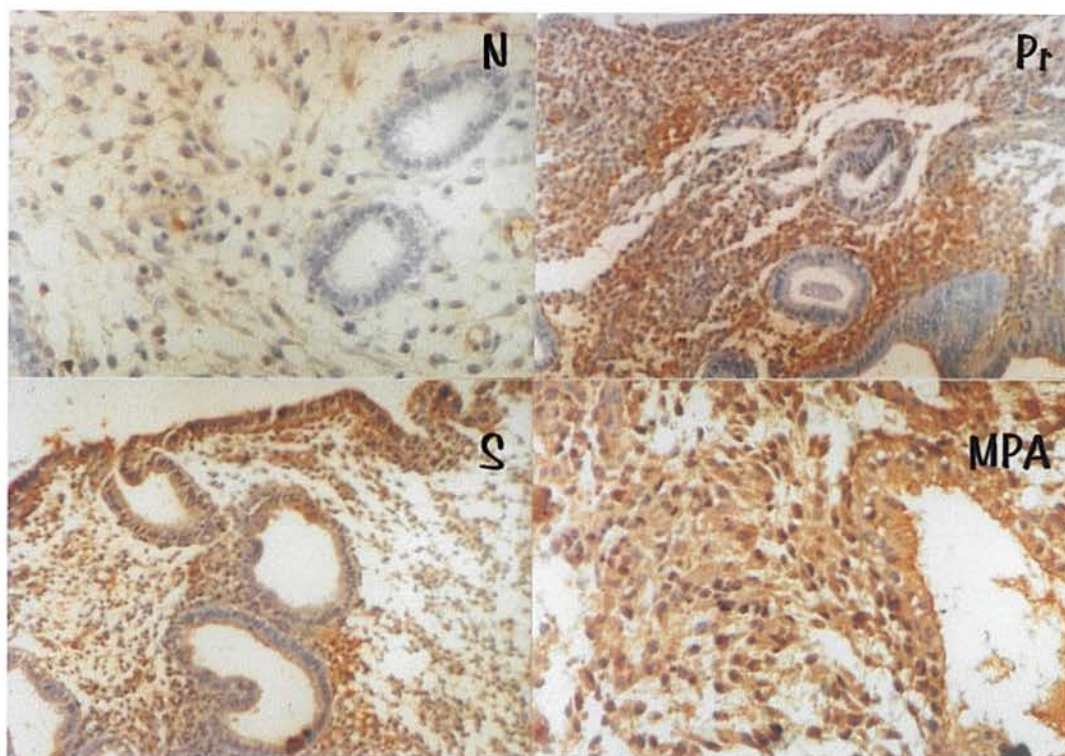
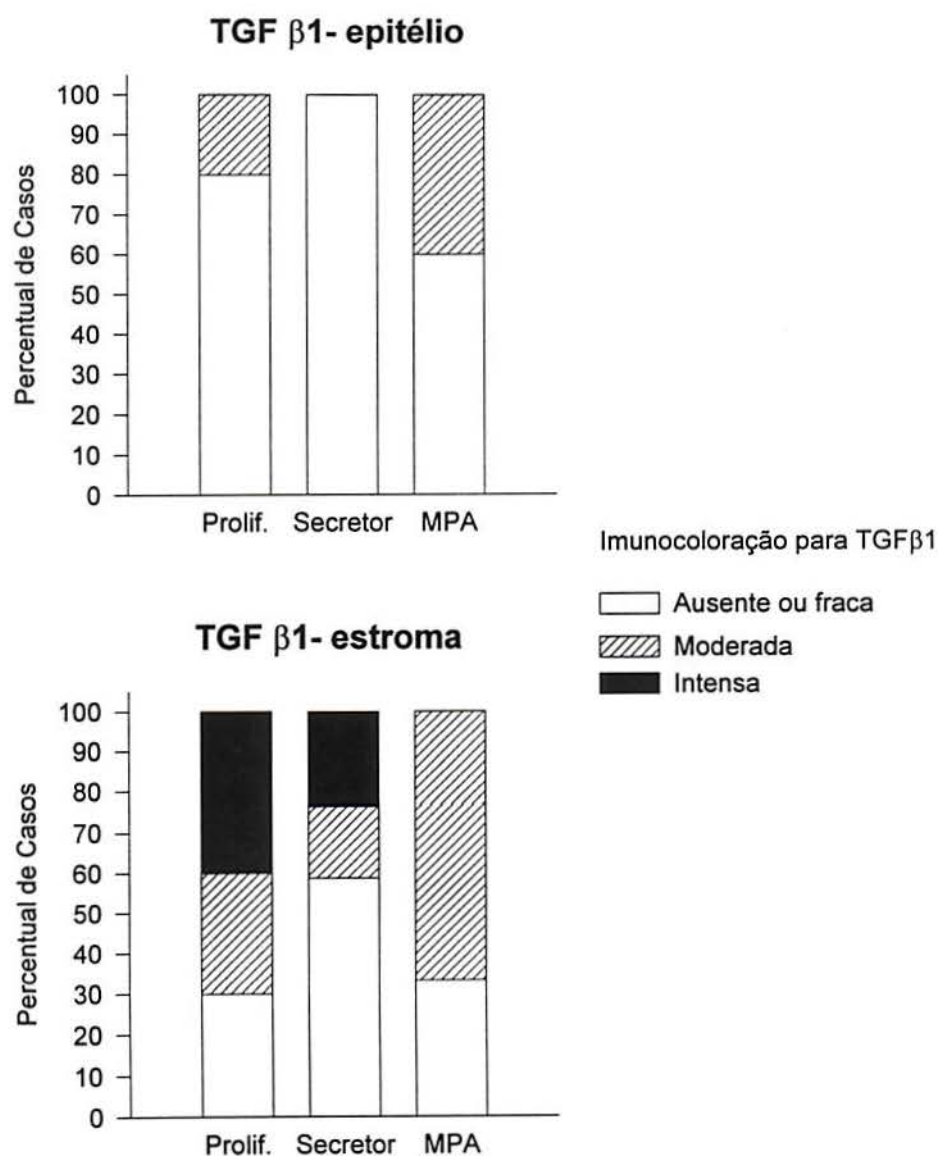


FIGURA 3-13

Fotomicrografias mostrando tecido endometrial corado por imuno-histoquímica para TGFβ1. N = controle negativo, Pr = endométrio proliferativo/ placebo; S = endométrio secretor/ placebo; MPA = endométrio secretor/ MPA. A coloração castanha indica a presença de TGFβ1 (Pr e S, aumento de 200x; N e MPA, 400x).

**FIGURA 3-14**

Percentual de pacientes que apresentaram imunocoloração para TGF β 1 no epitélio glandular e no estroma endometrial, nos três grupos experimentais. Os resultados não foram estatisticamente diferentes (teste do χ^2).

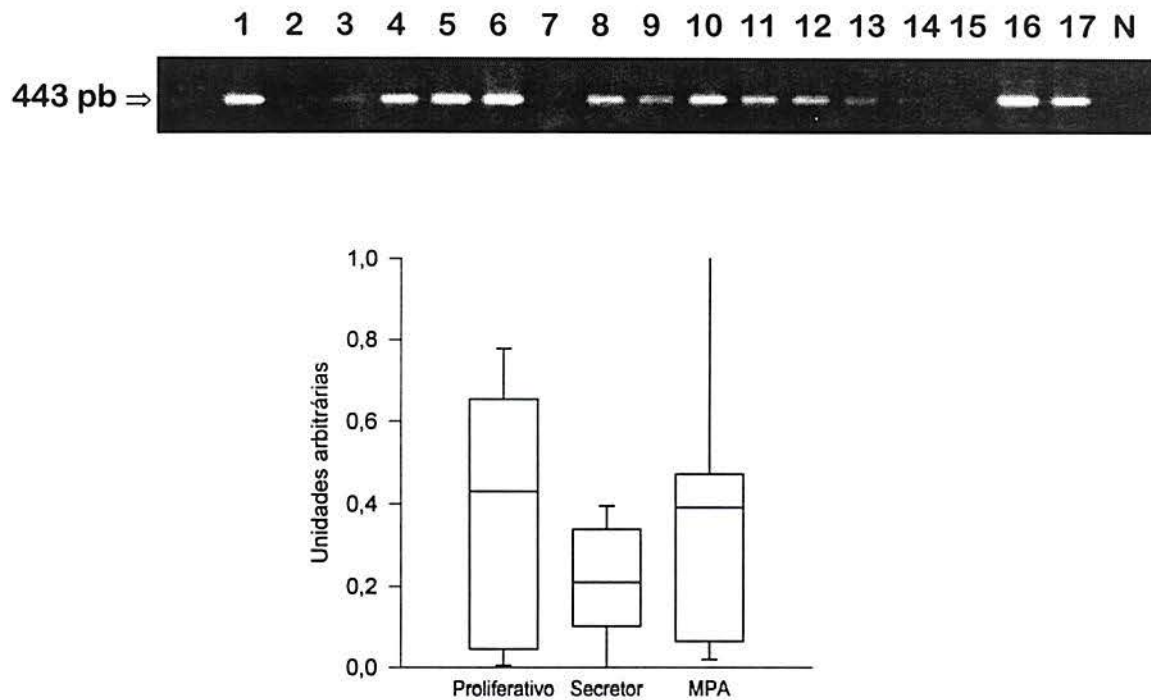


FIGURA 3-15

RT-PCR do $TGF\beta 1$ no endométrio humano. O fragmento de 443 pb, analisado em gel de agarose, corresponde ao mRNA do $TGF\beta 1$ nos grupos proliferativo (linhas 1 a 6), secretor (linhas 7 a 11) e MPA (linhas 12 a 17). N= controle negativo. A quantificação das bandas (unidades arbitrárias) foi corrigida pela expressão da β_2 -microglobulina. As colunas delimitam o intervalo interquartil, as linhas horizontais representam a mediana e as barras verticais indicam os percentis 10 e 90.

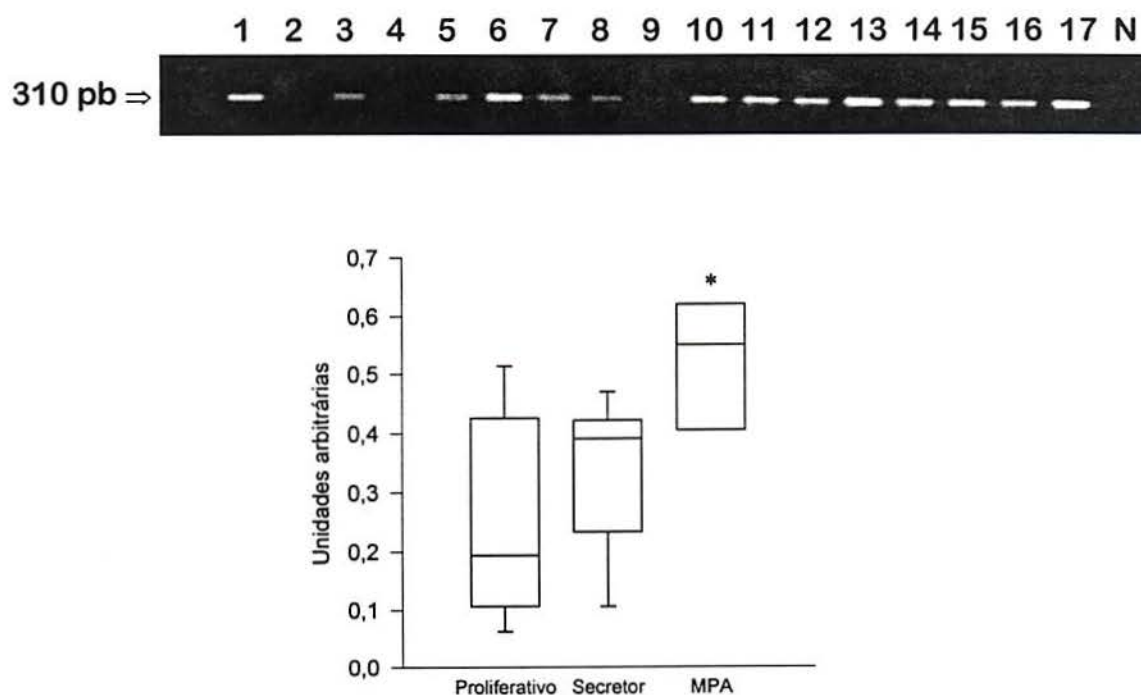


FIGURA 3-16

RT-PCR do TGF β 2 no endométrio humano. O fragmento de 310 pb, analisado em gel de agarose, corresponde ao mRNA do TGF β 2 nos grupos proliferativo (linhas 1 a 7), secretor (linhas 8 a 13) e MPA (linhas 14 a 17). N= controle negativo. A quantificação das bandas (unidades arbitrárias) foi corrigida pela expressão da β 2-microglobulina. As colunas delimitam o intervalo interquartil, as linhas horizontais representam a mediana e as barras verticais indicam os percentis 10 e 90. * $p=0,058$ vs grupo proliferativo (teste de Mann-Whitney).

Fator de Crescimento TGF β 3

TGF β 3 imunorreativo

A presença de TGF β 3 foi detectada com maior intensidade no epitélio luminar e glandular (Fig. 3-17). A proporção de pacientes que apresentaram imunocoloração para TGF β 3 no epitélio glandular foi de apenas 9,1% no grupo 1, aumentando para 41,2% no grupo 2 e 87,5% no grupo 3 ($\chi^2 = 15,4$; gl = 4; p=0,004). No estroma endometrial, o TGF β 3 foi detectado em 9,1% das pacientes do grupo 1, 5,9% do grupo 2 e 62,5% do grupo 3 ($\chi^2 = 10,6$; gl = 2; p=0,005; Fig. 3-18).

Como ilustra a figura 3-19, a expressão de TGF β 3 no epitélio glandular foi-se tornando mais freqüente no decorrer da diferenciação do endométrio secretor ($\chi^2 = 7,9$; gl = 1; p = 0,004).

mRNA do TGF β 3 no endométrio

Na fase proliferativa houve maior heterogeneidade na expressão gênica de TGF β 3: algumas pacientes tiveram expressão muito baixa e outras ficaram no mesmo patamar da fase secretora. A figura 3-20 mostra uma tendência de aumento do mRNA para TGF β 3 nos grupos 2 e 3, comparados ao grupo 1. Quando as pacientes foram redistribuídas de acordo com a biópsia endometrial em 5 grupos (proliferativo inicial e intermediário, secretor inicial, intermediário e tardio) houve uma correlação direta ($r = 0,437$; p=0,08) entre o mRNA para TGF β 3 e a datação endometrial.

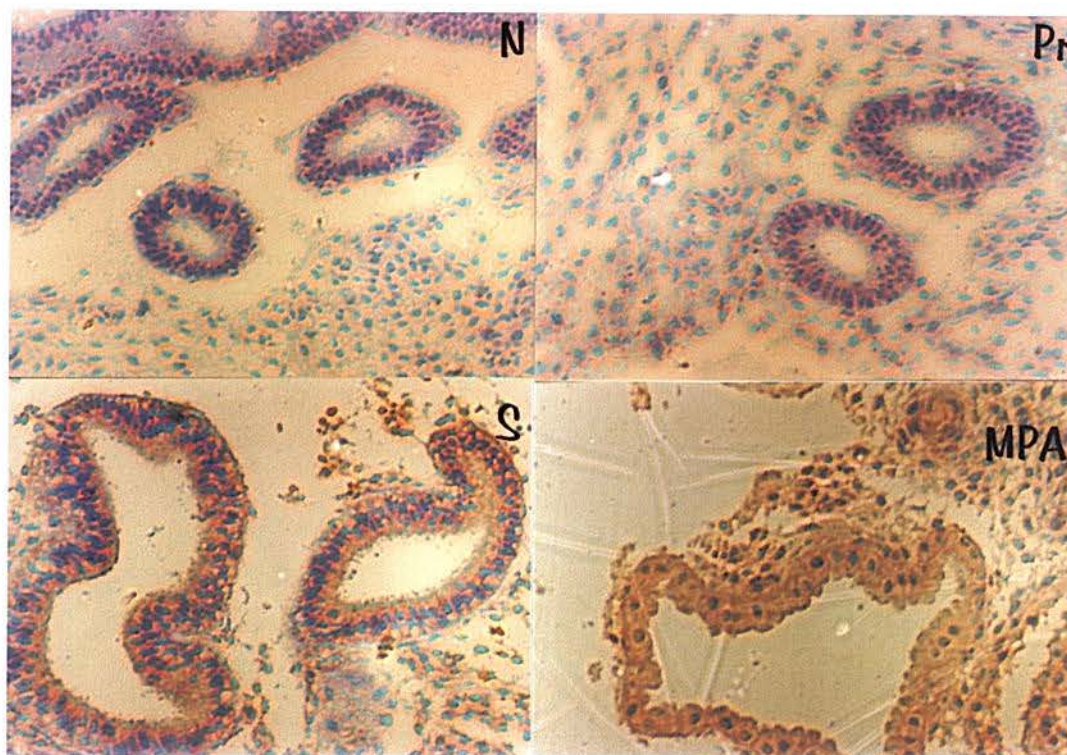
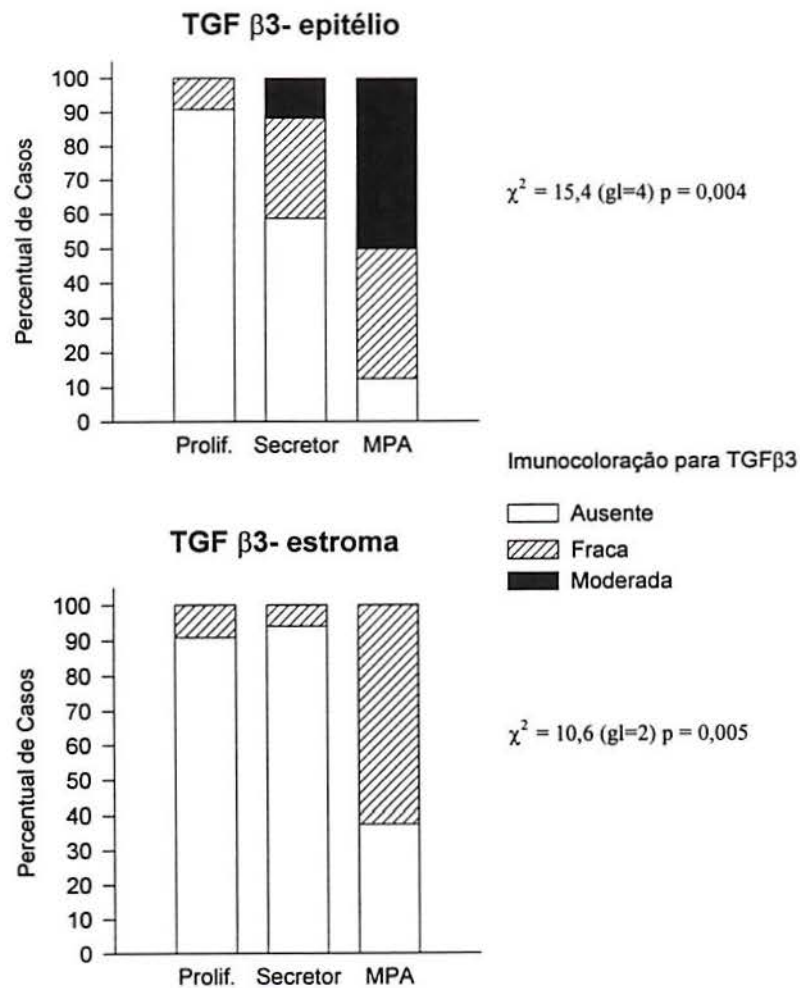
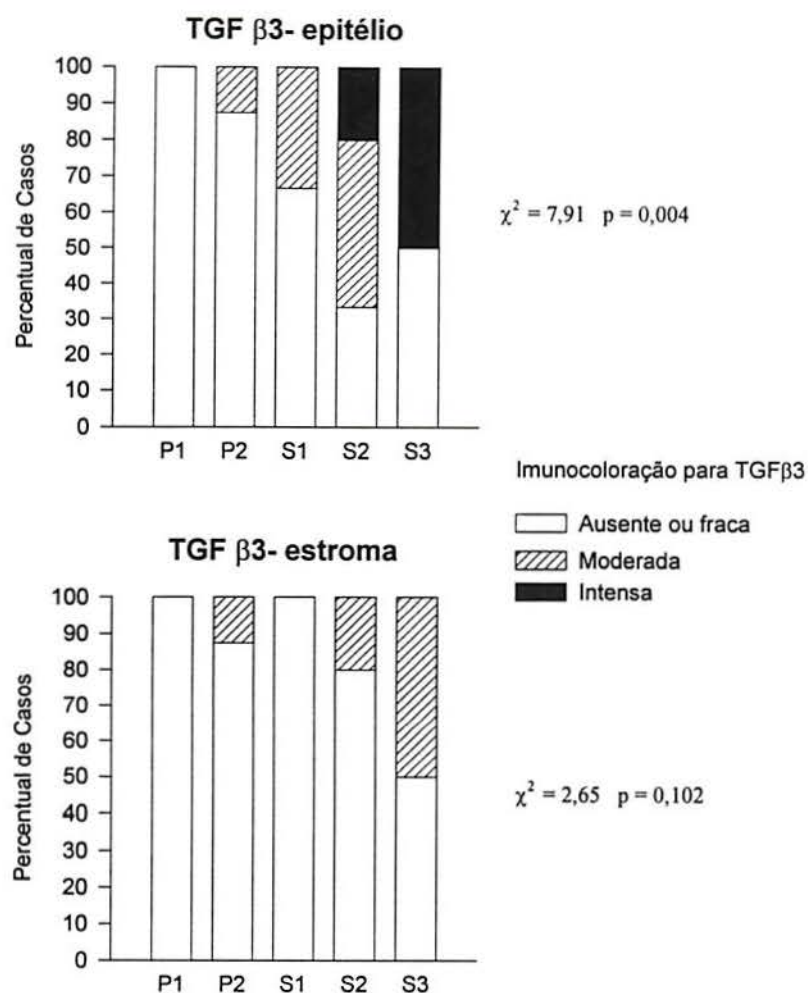


FIGURA 3-17

Fotomicrografias mostrando tecido endometrial corado por imuno-histoquímica para TGFβ3. N = controle negativo, Pr = endométrio proliferativo/ placebo; S = endométrio secretor/ placebo; MPA = endométrio secretor/ MPA. A coloração castanha indica a presença de TGFβ3 (aumento de 400x).

**FIGURA 3-18**

Percentual de pacientes que apresentaram imunocoloração para TGF β 3 no epitélio glandular e no estroma endometrial, nos três grupos experimentais. Os valores de χ^2 foram calculados pelo log-likelihood ratio.

**FIGURA 3-19**

Percentual de pacientes que apresentaram imunocoloração para TGF β 3 no epitélio glandular e no estroma em etapas sucessivas da diferenciação endometrial. As pacientes de todos os grupos experimentais foram reagrupadas em endométrio proliferativo inicial (P1), proliferativo intermediário (P2), secretor inicial (S1), secretor intermediário (S2) e secretor tardio (S3). Os valores de χ^2 foram calculados para a associação linear entre as variáveis (teste de Mantel-Haenszel, $gl = 1$).

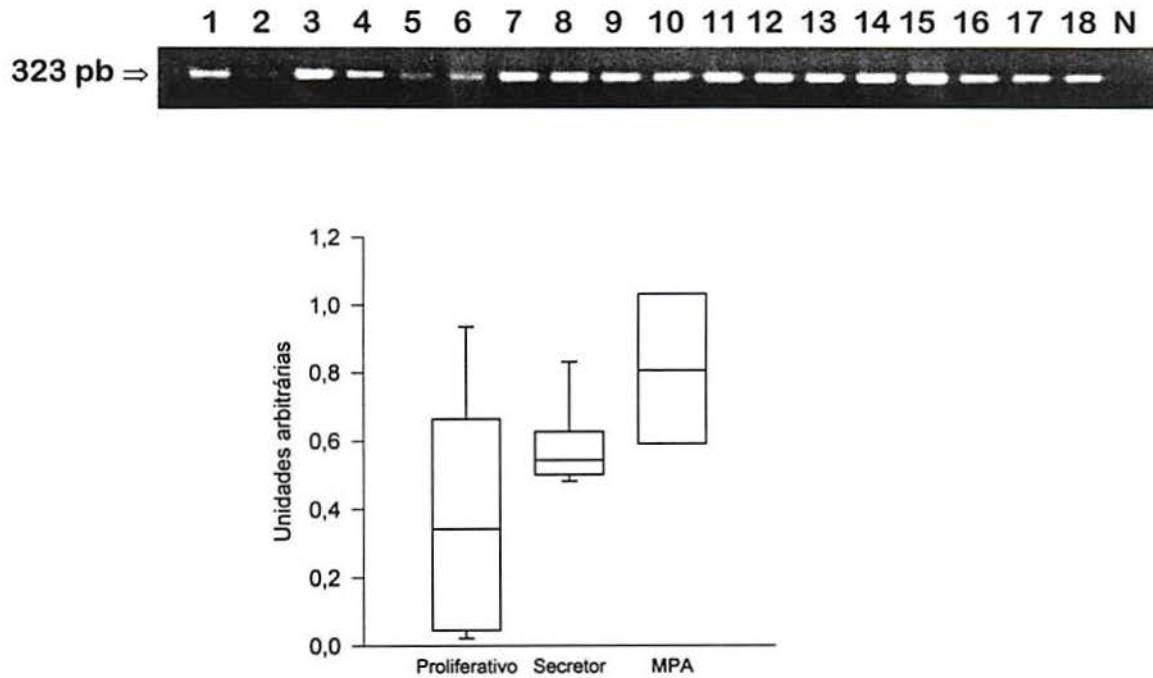


FIGURA 3-20

RT-PCR do TGF β 3 no endométrio humano. O fragmento de 323 pb, analisado em gel de agarose, corresponde ao mRNA do TGF β 3 nos grupos proliferativo (linhas 1 a 7), secretor (linhas 8 a 13) e MPA (linhas 14 a 18). N= controle negativo. A quantificação das bandas (unidades arbitrárias) foi corrigida pela expressão da β_2 -microglobulina. As colunas delimitam o intervalo interquartil, as linhas horizontais representam a mediana e as barras verticais indicam os percentis 10 e 90.

β_2 -microglobulina

mRNA da β_2 -microglobulina no endométrio

Como ilustra a figura 3-21, o produto de RT-PCR correspondente ao mRNA da β_2 -microglobulina foi semelhante nos três grupos experimentais.

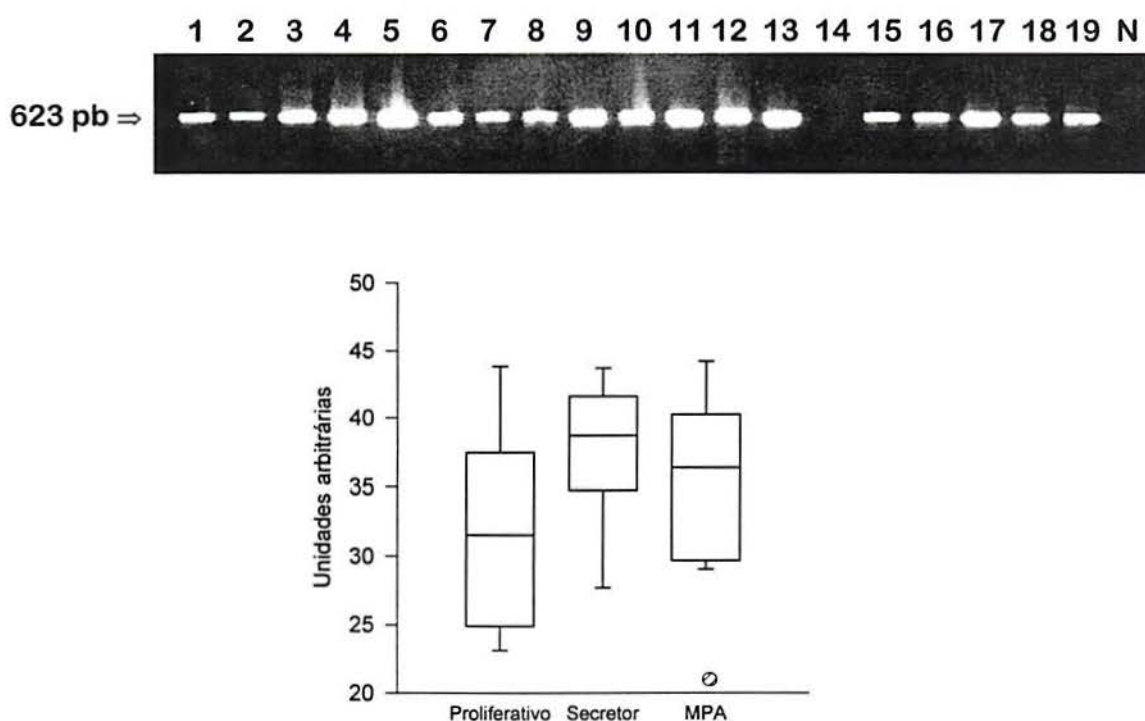


FIGURA 3-21

RT-PCR da β_2 -microglobulina no endométrio humano. O fragmento de 623 pb, analisado em gel de agarose, corresponde ao mRNA da β_2 -microglobulina nos grupos proliferativo (linhas 1 a 7), secretor (linhas 8 a 13) e MPA (linhas 14 a 19). N= controle negativo. A quantificação das bandas é expressa em unidades arbitrárias. As colunas delimitam o intervalo interquartil, as linhas horizontais representam a mediana e as barras verticais indicam os percentis 10 e 90, enquanto o círculo indica um valor abaixo do percentil 5.

As alterações morfológicas por que passa o endométrio humano ao longo do ciclo menstrual são conhecidas de longa data e foram sistematizadas para aplicação clínica há 48 anos no trabalho clássico de Noyes, Hertig & Rock que inaugurou a revista *Fertility & Sterility*¹¹⁰. O mesmo não acontece com as alterações funcionais, que ainda são apenas parcialmente conhecidas e não nos permitem substituir a biópsia endometrial por testes bioquímicos menos invasivos, capazes de indicar o grau de proliferação e diferenciação do tecido³⁷. Além da aplicação diagnóstica, o conhecimento dos mecanismos moleculares que coordenam o crescimento, a decidualização e a renovação do endométrio nos daria a base fisiológica para explorar a fisiopatologia dos distúrbios menstruais, das hiperplasias e neoplasias do endométrio, da endometriose e de muitos casos de infertilidade sem causa aparente.

Nas últimas décadas, foram sendo identificados indutores de proliferação celular, como EGF e TGF α ,^{20,59,66} e marcadores bioquímicos da diferenciação do endométrio, com destaque para a PRL – cuja secreção *in vitro* reflete a transformação morfofuncional das células estromais expostas a estímulo progestogênico continuado^{148,172} – e a IGFBP-1, secretada por células adequadamente estimuladas pela progesterona ou por um de seus agonistas^{51,146,147}. Esses estudos sempre adotaram os seguintes paradigmas: (1) alterações da bioquímica endometrial ao longo do ciclo menstrual se devem aos efeitos do estradiol e da progesterona sobre o endométrio; (2) o efeito de esteróides e citocinas sobre células

endometriais ou deciduais cultivadas corresponde ao efeito das mesmas substâncias sobre o endométrio e a decídua *in vivo*. Esses paradigmas, embora bem fundamentados, têm suas limitações conceituais. Em animais de laboratório, a maior liberdade de administrar drogas e recolher amostras de tecido impulsionou estudos elegantes que demonstraram, com muita segurança, o efeito de esteróides sexuais sobre a síntese de hormônios e citocinas no endométrio^{23,85,108,109}. As dificuldades éticas e operacionais têm limitado muito essa abordagem em seres humanos, o que possivelmente explicaria a freqüente discordância entre resultados de diferentes estudos.

Por isso, é importante destacar que o presente trabalho é o primeiro a adotar a estratégia do ensaio clínico randomizado para avaliar o efeito de um progestogênio sobre a produção de PRL, *c-fos* e TGF β no endométrio humano. Em função da alta confiabilidade deste delineamento experimental, os resultados nos permitiram identificar precisamente quais das proteínas estudadas têm sua expressão estimulada ou inibida pelo progestogênio. Também foi possível correlacionar os achados com os níveis de estradiol e progesterona ao longo do ciclo menstrual. Além disso, nosso modelo de estudo permitiu caracterizar o efeito luteomimético do MPA em relação ao padrão fisiológico da fase secretora, classificando-o como semelhante ou mais intenso que o efeito da progesterona natural secretada pelo corpo lúteo.

Os resultados aqui apresentados demonstram que o processo de diferenciação do endométrio proliferativo em secretor e sua subsequente decidualização, sob efeito da progesterona, coincide com aumento da transcrição gênica e da expressão tecidual de PRL e TGF β 3. Ao mesmo tempo, o fim da fase proliferativa e a redução relativa dos níveis de estradiol em relação à progesterona resulta na diminuição drástica da expressão de *c-fos* no endométrio. Essas transformações moleculares associadas ao ciclo menstrual e ao uso de MPA não são apenas epifenômenos da diferenciação morfológica do endométrio. Existem fortes indícios de que as alterações estruturais e funcionais observadas no ciclo endometrial sejam fenômenos indissociáveis, como discutiremos mais adiante.

Características gerais da amostra estudada

Os três grupos de pacientes foram homogêneos quanto às características demográficas e ao padrão dos ciclos menstruais, de modo que estes não poderiam ser considerados fatores de confusão capazes de influenciar os resultados obtidos. Os níveis séricos de PRL também foram semelhantes entre os grupos e nenhuma paciente apresentava hiperprolactinemia. Embora a regulação da PRL endometrial seja independente da regulação hipofisária⁵³, ainda não existem estudos conclusivos sobre o efeito da PRL sistêmica sobre a produção de PRL no endométrio. Por isso, preferimos nos assegurar de que nossa amostra não incluía pacientes hiperprolactinêmicas.

Aspectos Metodológicos

A interpretação dos resultados aqui apresentados deve levar em conta alguns aspectos metodológicos que lhes conferem a necessária confiabilidade e aplicabilidade externa. Para evitar que os resultados fossem influenciados por vieses de seleção, confusão ou interpretação, procuramos aplicar critérios de controle de qualidade não apenas no delineamento experimental mas também nas técnicas laboratoriais utilizadas. Com isso procuramos evitar resultados falsamente positivos ou negativos e adotar critérios que nos permitissem não apenas descrever a presença ou ausência do mRNA e da proteína em estudo, mas também comparar os indivíduos e os grupos experimentais da forma mais objetiva e precisa possível.

A padronização dos protocolos de imuno-histoquímica foi feita com o objetivo de determinar empiricamente as condições mais adequadas para se obter coloração específica e, ao mesmo tempo, diferenciar entre amostras com expressão forte ou fraca do antígeno em estudo. Para isso, testamos uma série de concentrações do anticorpo primário em tecidos que sabidamente deveriam expressar o antígeno (controle positivo). Estes tecidos foram placenta a termo, no

caso da PRL e TGF β , e endométrio proliferativo, no caso do *c-fos*. Estabelecida a concentração mínima do anticorpo primário capaz de produzir imunocoloração nos controles positivos, procuramos trabalhar com concentrações pouco superiores à mínima. Evitamos utilizar excesso de anticorpo para reduzir a coloração inespecífica e obter melhor discriminação da intensidade da cor.

Para saber a dimensão exata da coloração inespecífica, utilizamos como controle negativo os mesmos tecidos que sabidamente expressam o antígeno, com a diferença de que o anticorpo primário foi substituído por soro normal da mesma espécie. Por exemplo, se o anticorpo primário fosse produzido em coelho, seu controle negativo recebia soro normal de coelho. Este detalhe é importante, porque o soro normal de outra espécie não teria reagido com o anticorpo secundário anti-coelho e isso teria produzido um controle negativo impróprio, incapaz de revelar as ligações inespecíficas do anticorpo biotinilado com outras proteínas, inclusive imunoglobulinas, presentes na solução do anticorpo primário. Muitas amostras que consideramos negativas neste estudo apresentavam uma imunocoloração fraca, semelhante à do controle negativo. Estas amostras teriam sido consideradas erroneamente positivas se fossem comparadas a um controle negativo impróprio, feito sem o soro normal da mesma espécie que gerou o anticorpo primário.

Portanto, quando nos referimos à presença de imunocoloração para PRL, *c-fos* ou TGF β nas biópsias endometriais estamos nos referindo à coloração produzida somente nos sítios de ligação da imunoglobulina específica (existente apenas no soro do animal imunizado com o antígeno em questão), descontada a coloração produzida pela ligação do complexo ABC a qualquer outro sítio antigênico, inclusive imunoglobulinas inespecíficas. Por outro lado, quando nos referimos à ausência de imunocoloração para PRL, *c-fos* ou TGF β nas biópsias endometriais não podemos excluir a existência de quantidades mínimas dessas proteínas, mas podemos afirmar que o método imuno-histoquímico tem sensibilidade suficiente para identificar concentrações fisiológicas em tecido humano processado de forma idêntica.

A avaliação do mRNA por RT-PCR foi feita com os cuidados necessários para evitar falsos positivos e falsos negativos, descritos em detalhe no capítulo 2. Outro aspecto importante da RT-PCR é que o produto final só é proporcional ao número de ciclos até um certo ponto, a partir do qual o sistema fica saturado pelo consumo da enzima e dos nucleotídeos. O excesso de ciclos de PCR prejudicaria a comparação da expressão gênica entre diferentes indivíduos, pois o sistema saturado produziria um número de cópias de cDNA que não guardaria a devida proporção com o mRNA. Quando isso acontece, a reação que começa com mais cDNA (indivíduo com maior expressão gênica) esgota os reagentes antes e não amplifica mais o produto nos ciclos finais de PCR, enquanto a reação que começa com menos cDNA continua a ter o fragmento amplificado nos últimos ciclos, distorcendo os resultados.

Neste trabalho, procuramos utilizar um número de ciclos de PCR inferior ao limite de amplificação das reações, mas superior ao mínimo necessário para a obtenção de produto visível no gel. Este cuidado nos assegurou a possibilidade de comparar as diferentes amostras sem a influência de artefatos como a saturação dos reagentes por excesso de ciclos ou a baixa sensibilidade por insuficiência de ciclos. O número de ciclos adotado em cada protocolo permitiu discriminar entre amostras com diferentes concentrações de cDNA, como atestam as curvas de quantidades de cDNA apresentadas no capítulo 2.

Portanto, ao comparar as medidas densitométricas dos fragmentos específicos de cDNA amplificados por PCR estamos indiretamente comparando, com alto grau de confiabilidade, as concentrações iniciais do cDNA de cada paciente e, por extensão, as concentrações do mRNA que deu origem ao cDNA.

Prolactina Endometrial

No presente estudo, a proporção de pacientes com expressão de PRL endometrial foi muito maior na fase secretora que na fase proliferativa dos ciclos espontâneos, e maior ainda no grupo que usou MPA. O mesmo ocorreu com os níveis de mRNA para PRL, que foram especialmente mais altos nas amostras de endométrio das pacientes que receberam MPA. Além disso, a proporção de pacientes com secreção detectável de PRL no endométrio aumentou gradativamente com o avanço da diferenciação endometrial e foi máxima na fase secretora tardia, quando os níveis de progesterona já entravam em declínio. Analisados em conjunto, esses dados reforçam consistentemente a idéia de que a secreção de PRL é uma consequência da diferenciação das células estromais pela progesterona (ou progestogênio). Nossos resultados não permitem excluir a hipótese de que o MPA possa induzir a secreção de PRL endometrial nos primeiros dias de estímulo, antes da reação pré-decidual. Os dados provenientes da cultura de células estromais^{148,172} são frontalmente contrários a esta hipótese, uma vez que a secreção de PRL só inicia depois de alguns dias de incubação com MPA e após a diferenciação morfológica das células. Essas conclusões têm sido simplesmente extrapoladas para o efeito dos progestogênios *in vivo*, mas não temos conhecimento de nenhum experimento clínico que tenha caracterizado a latência da secreção endometrial de PRL em pacientes tratadas com MPA.

Quando observamos a presença de PRL no endométrio secretor, a imunorreatividade não se restringiu ao estroma, mas foi observada também no epitélio luminal e glandular. Embora este dado possa sugerir que as glândulas endometriais também secretam PRL, o mais provável é que elas apenas captem o hormônio produzido pelas células estromais adjacentes. Falam a favor desta hipótese as evidências fornecidas pela hibridização *in situ*, em que não se observou mRNA para PRL nas células epiteliais da decídua,^{151,152} e pela cultura de células epiteliais isoladas, que não secretaram PRL no meio¹²⁴. Ainda assim, nossos dados suscitam a especulação de que talvez a PRL produzida no estroma exerça uma função parácrina sobre as glândulas endometriais, regulando a se-

creção de muco ou mesmo modulando a proliferação e a renovação do epitélio glandular¹⁰⁷.

A presença de PRL foi observada em apenas uma das 11 amostras de endométrio proliferativo, mas níveis detectáveis de mRNA para PRL foram observados em 4 das 7 amostras estudadas. Esses dados demonstram que a transcrição do gene da PRL não é uma exclusividade do endométrio longamente exposto à ação da progesterona, contrariando os estudos *in vitro*^{28,70,124} e os estudos transversais baseados apenas na identificação da PRL, não do seu mRNA^{82,99}. Essa discordância poderia ser explicada pela diferença de sensibilidade dos métodos, uma vez que a técnica de RT-PCR permite revelar quantidades mínimas de mRNA que não geram necessariamente quantidades detectáveis da proteína codificada. A presença do mRNA da PRL no endométrio proliferativo, sem a correspondente expressão da proteína, também poderia ser explicada pela existência de mecanismos de regulação pós-transcricional da síntese de PRL.

Portanto, os dados aqui apresentados indicam que a expressão de PRL é mínima no endométrio proliferativo, aparece após a ovulação e torna-se mais intensa à medida que o endométrio se diferencia durante a fase secretora, podendo ser ampliada pelo MPA para além dos padrões fisiológicos. A presença de PRL poderia ser utilizada como mais um indicador da decidualização endometrial *in vivo*, não apenas na avaliação de ciclos espontâneos, mas também no controle de pacientes em uso de progestogênio. Como demonstram nossos resultados, a época ideal para biópsia com esta finalidade é a fase lútea tardia, quando a presença de PRL endometrial é esperada em todas as pacientes ovulatórias ou em uso de MPA.

Além da aplicação diagnóstica, a PRL endometrial poderia servir como parâmetro de referência em futuros experimentos envolvendo a diferenciação do endométrio humano, por ser um achado sensível, específico e consistentemente reproduzível, que confirma a datação endometrial e reforça a confiabilidade das técnicas laboratoriais utilizadas.

c-fos

Neste trabalho nos propusemos a avaliar experimentalmente, pela primeira vez, o efeito de um esteróide sexual sobre a expressão de *c-fos* no endométrio humano. Um estudo transversal divulgado recentemente havia sugerido que a expressão de *c-fos* no endométrio humano predomina na fase proliferativa em relação à fase secretora do ciclo menstrual e torna-se quase indetectável durante a gravidez¹³³. Como o *c-fos* atua como mediador e amplificador da ação proliferativa do estrogênio sobre os tecidos alvo, especialmente o endométrio¹⁰³, sua inibição poderia ser um mecanismo chave para o efeito antiproliferativo da progesterona nesses tecidos. Nossos dados abrem a perspectiva de se estudar o efeito progestogênico de outras drogas, além do MPA, tendo como parâmetro não apenas a morfologia do endométrio mas também os efeitos moleculares que o protegeriam da proliferação celular desordenada, como a inibição do *c-fos* aqui demonstrada.

A expressão de *c-fos* (mRNA e proteína) foi intensamente reduzida na fase secretora do ciclo menstrual com ou sem uso de MPA, e a presença de *c-fos* imunorreativo foi eliminada pelo tratamento com MPA. Esses achados demonstram que a expressão de *c-fos* no endométrio humano é muito bem controlada ao longo do ciclo menstrual, e sugerem que a progesterona possa comandar a inibição pós-ovulatória da síntese de *c-fos*. O mecanismo pelo qual a progesterona poderia inibir a expressão de *c-fos* no endométrio humano ainda não foi esclarecido, mas experimentos em ratas sugerem que se trata de uma bloqueio direto ou indireto da transcrição gênica⁸⁵. As propriedades antiestrogênicas da progesterona (diminuição da oferta de receptores, aceleração do metabolismo) são insuficientes para explicar a inibição da expressão de *c-fos* no útero da rata, uma vez que a progesterona não inibiu a expressão de *c-myc* e *c-jun* induzida por estradiol no mesmo modelo experimental⁸⁵.

A expressão de *c-fos* foi mais intensa na fase proliferativa intermediária que na inicial, coincidindo com os níveis mais altos de estradiol sérico e guardando uma correlação direta com a concentração deste hormônio. Estes dados

são fortemente sugestivos de que o estradiol produzido pelo ovário na fase folicular seja o principal determinante da expressão de *c-fos* no endométrio. Experimentos em ratas corroboram esta hipótese, uma vez que em animais imaturos a expressão gênica de *c-fos* pode ser induzida pelo tratamento com estradiol, de forma dose-dependente^{23,85}. A existência de um elemento responsivo ao estrogênio no gene do *c-fos* humano reforça as evidências em favor de um controle direto da transcrição de *c-fos* pelo complexo estrogênio-receptor¹⁶⁹.

Nossos resultados indicam, pela primeira vez, que a expressão de *c-fos* no endométrio humano durante a fase proliferativa do ciclo menstrual é mais intensa nas células estromais que no epitélio glandular. Este achado sugere que o *c-fos* seja um importante mediador (e possivelmente amplificador) do estímulo estrogênico sobre a proliferação do estroma endometrial. A expressão de *c-fos* no epitélio glandular, embora dispersa e restrita a poucas pacientes, limitou-se ao endométrio proliferativo intermediário e coincidiu com o pico de estradiol sérico. A presença de *c-fos* no epitélio endometrial já foi demonstrada em suínos³⁴ e roedores^{7,115}. Também se observou que o estradiol induz a transcrição de mRNA para *c-fos* numa linhagem de células de adenocarcinoma de endométrio⁴⁶. Demonstrou-se aumento do mRNA de *c-fos* no adenocarcinoma de endométrio, especialmente naqueles casos em que a neoplasia era mais diferenciada⁴⁵. Portanto, é possível que, em condições patológicas, o estrogênio aumente a expressão de *c-fos* não apenas no estroma mas também nas glândulas endometriais.

TGFβ

Nossos resultados demonstram que a regulação do TGFβ no endométrio humano é independente para as suas várias isoformas. Enquanto a expressão de TGFβ1 foi mais proeminente no estroma que no epitélio e não variou com o ciclo menstrual nem com MPA, a expressão de TGFβ3 (e TGFβ2, como sugerem os dados preliminares) predominou no epitélio, foi maior na fase secretora que na

fase proliferativa e ainda maior nas pacientes que usaram MPA.

O padrão cíclico que observamos na expressão endometrial de TGF β reforça as primeiras observações de Gold *et al.*⁵⁴, que também estudaram biópsias coradas por imuno-histoquímica. Além disso, nossos dados sugerem que a progesterona tenha uma participação importante no aumento de TGF β 3 que ocorre no endométrio secretor, uma vez que as amostras provenientes de pacientes tratadas com MPA tiveram imunocoloração mais intensa e níveis mais altos de mRNA para TGF β 3 em comparação com as que tomaram placebo, inclusive na fase secretora. O aumento de mRNA para TGF β 3 na fase secretora inicial e intermediária foi observado por autores que utilizaram hibridização *in situ*²¹, mas outros autores encontraram níveis mais altos de mRNA (determinados por *Northern blot*) no endométrio coletado na fase folicular³. Estes últimos, entretanto, não confirmaram se as amostras obtidas na fase lútea eram efetivamente de endométrio secretor, nem correlacionaram os achados com os níveis circulantes de esteróides sexuais. Portanto, nossos dados e os de outros autores que estudaram a expressão de TGF β 3 no endométrio humano sugerem, de forma congruente, que este fator de crescimento é sintetizado e secretado tanto pelas células epiteliais como estromais e tem sua expressão aumentada no endométrio secretor, provavelmente em consequência do estímulo promovido pela progesterona.

Pelo menos dois mecanismos básicos podem ser sugeridos para explicar como os progestogênios estimulam a síntese e secreção de TGF β 3 pelo endométrio. O complexo progesterona-receptor poderia modular diretamente a transcrição gênica do TGF β 3 ou poderia atuar indiretamente, inibindo os efeitos do estradiol. Esses mecanismos não foram ainda testados no endométrio, mas os dados provenientes de outras células demonstram que o estradiol tem efeito supressor sobre a síntese de TGF β 2 e TGF β 3⁴, o que abre a possibilidade de que o efeito anti-estrogênico da progesterona favoreça a expressão dos mesmos fatores de crescimento.

Controle integrado do ciclo endometrial

Os dados aqui apresentados nos permitem discutir o papel que caberia à PRL, *c-fos* e TGF β no complexo processo de crescimento e diferenciação por que passa o endométrio durante cada ciclo menstrual (Fig. 4-1).

A secreção de PRL é uma característica da célula estromal diferenciada pela progesterona. Sua função ainda é objeto de hipóteses especulativas, mas a continuidade da secreção de PRL pelas células decíduais durante a gravidez sugere que os efeitos da PRL sobre o feto e sobre o ambiente uterino na gestação sejam fisiologicamente relevantes⁹.

O papel do *c-fos* parece ser o de amplificar o estímulo estrogênico para a proliferação das células estromais e, possivelmente, também das células epiteliais. Assim como outros protooncogenes, a ativação do *c-fos* é um sinal mitogênico que atua na própria célula, aumentando a transcrição de outros genes que em última análise comandam a divisão celular¹⁴³. O estreito controle da expressão de *c-fos* ao longo do ciclo menstrual e sua potente inibição pelo MPA sugerem que este oncogene seja um dos mediadores da ação mitogênica do estradiol sobre o endométrio. Apesar da comprovação experimental de que o estradiol aumenta a transcrição de *c-fos* no útero^{23,85,115}, ainda é preciso esclarecer se a indução de *c-fos* apenas contribui ou é indispensável para que o efeito proliferativo do estrogênio seja alcançado.

Quanto ao TGF β , as evidências apontam para um efeito antiproliferativo das três isoformas, mas o TGF β 3 e, em menor escala, o TGF β 2, são os que têm sua síntese endometrial estimulada pela progesterona e pelo MPA. A função do TGF β seria atuar como mediador parácrino da ação da progesterona, limitando o crescimento e estimulando a diferenciação do endométrio¹⁵⁴.

Além dos fatores por nós estudados, um grande número de mediadores está envolvido na ampliação e modulação do sinal dos esteróides no endométrio. Outros fatores de crescimento, protooncogenes, enzimas, eicosanóides, proteínas de transporte e citocinas interagem entre si e com os esteróides ovarianos de

modo a controlar as mitoses de cada tipo celular, o balanço hidro-eletrolítico, a permeabilidade capilar, a neovascularização, a secreção glandular e a renovação cíclica do endométrio. Apesar de tantos efetores, os hormônios que efetivamente comandam o ciclo endometrial em condições fisiológicas são apenas estradiol e progesterona. As razões que expliquem, do ponto de vista evolutivo ou mesmo teleológico, o benefício de um sistema tão complexo capaz de coordenar as mesmas funções celulares com tantas substâncias codificadas por genes diversos ainda não estão suficientemente claras. Ao que tudo indica, o entendimento desses mecanismos possibilitará descobrir quais deles estão alterados em cada doença e propor tratamentos mais racionais, para além da simples administração de esteróides – que comandam, mas são apenas parte da história.

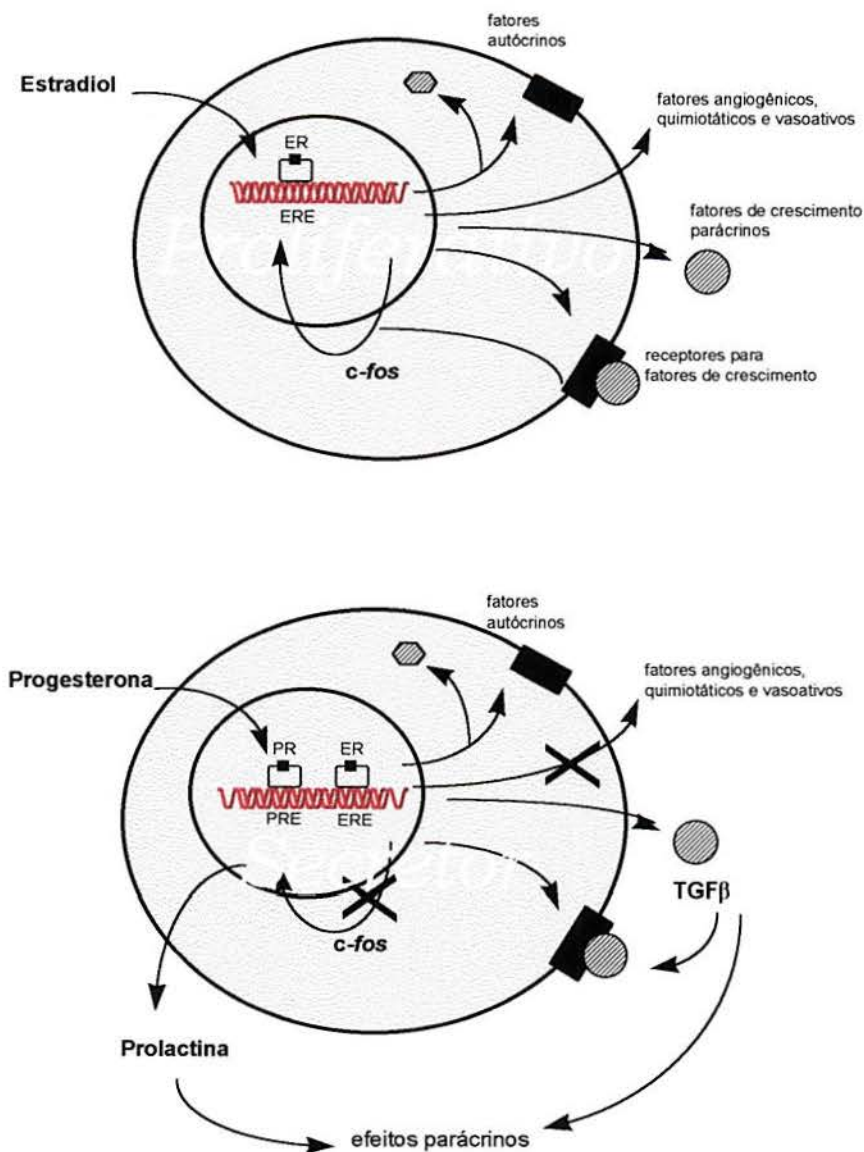


FIGURA 4-1

Esquema representativo da participação da prolactina, *c-fos* e TGFβ no controle da proliferação e diferenciação do endométrio humano durante o ciclo menstrual.

O esquema é derivado da Figura 1-1 e baseado na referência 103.

ER: receptor de estrogênio; ERE: elemento responsivo ao estrogênio; PR: receptor de progesterona; PRE: elemento responsivo à progesterona.

Conclusões

Os resultados aqui apresentados nos permitiram concluir que:

- 1) A expressão de PRL endometrial é característica da fase secretora do ciclo menstrual e pode ser intensificada pelo uso oral de MPA, na dose e tempo investigados (10 mg/dia, 10 dias).
- 2) A expressão de PRL endometrial aumenta proporcionalmente ao grau de diferenciação histológica do endométrio.
- 3) A expressão de *c-fos* no endométrio é característica da fase proliferativa do ciclo menstrual, predomina nos núcleos das células estromais e é potentemente inibida pelo MPA.
- 4) A expressão de *c-fos* no endométrio guarda relação direta com os níveis séricos de estradiol e inversa com a relação progesterona/estradiol.
- 5) A expressão de TGF β 1 no endométrio não se altera significativamente com o ciclo menstrual nem com o uso de MPA.
- 6) A expressão de TGF β 3 no endométrio é característica da fase secretora do ciclo menstrual e pode ser ampliada pelo uso oral de MPA.

O conjunto destes resultados sugere que:

- a PRL pode ser considerada um bom marcador bioquímico da decidualização do endométrio (espontânea ou induzida por progestogênio);
- a proteína *fos* é um provável mediador autócrino do efeito proliferativo do estradiol no endométrio humano;
- a regulação da síntese de TGF β 3 poderia ser um dos mecanismos pelos quais a progesterona (e os progestogênios) limita o crescimento e induz a diferenciação do endométrio.

Referências Bibliográficas

1. AHMED A, CAMERON IT, FERRIANI RA & SMITH SK (1992) Activation of phospholipase A2 and phospholipase C by endothelin-1 in human endometrium. *J Endocrinol* 135: 383-390.
2. ALLEN E & DOISY EA (1923) An ovarian hormone: preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. *JAMA* 81: 819-821.
3. ARICI A, MacDONALD PC & CASEY ML (1996) Modulation of the levels of transforming growth factor b messenger ribonucleic acids in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 54: 463-469.
4. ARRICK BA, KORC M & DERYNCK R (1990) Differential regulation of expression of three transforming growth factor b species in human breast cancer cell lines by estradiol. *Cancer Res* 50: 299-303.
5. ASHCROFT GS, DODSWORTH J, VAN BOXTEL E, et al (1997) Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta 1 levels. *Nat Med* 3: 1209-1215.
6. AUBERT ML, GRUMBACH MM & KAPLAN SL (1975) The ontogenesis of human fetal hormones. III. Prolactin. *J Clin Invest* 56: 155-164.
7. BAKER DJ, NAGY G & NIEDER GL (1992) Localization of c-fos-like proteins in the mouse endometrium during the per-implantation period. *Biol Reprod* 47: 492-501.
8. BARBOSA-COUTINHO LM (1988) Adenomas da hipófise: estudo imuno-histoquímico. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
9. BEN-JONATHAN N, MERSHON JL, ALLEN DL & STEINMETZ RW (1996) Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Rev* 17: 639-669.
10. BENEDETTO MT, TABANELLI S & GURPIDE E (1990) Estrone sulfate sulfatase activity is increased during in vitro decidualization of stromal cells of human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 342-345.
11. BLITHE DL, RICHARDS RG & SKARULIS MC (1991) Free alpha molecules from pregnancy stimulate secretion of prolactin from human decidual cells: A novel function for free alpha in pregnancy. *Endocrinology* 129: 2257-2259.
12. BONACCORSI G, PANSINI F, SEGALA V, BAGNI B, BERGAMINI CM & MOLLICA G (1989) Modification of number and affinity of endometrial EGF receptors during the menstrual cycle. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 33: 177-182.
13. BORDER WA & NOBLE NA (1994) Transforming growth factor b in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331: 1286-1292.
14. BORGUNDVAAG B, KUDLOW JE, MUELLER SG & GEORGE SR (1992) Dopamine receptor activation inhibits estrogen-stimulated transforming growth factor-a gene expression and growth in anterior pituitary, but not in uterus. *Endocrinology* 130: 3453-3458.
15. BRUNER KL, RODGERS WH, GOLD LI, et al (1995) Transforming growth factor b mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7362-7366.
16. BUIRCHELL BJ & HAHNEL R (1975) Metabolism of estradiol-17b in human endometrium during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem* 6: 1489-1494.
17. CAMAGGI CM (1998) Medroxyprogesterone acetate: pharmacokinetics and pharmacodynamics. <http://antlab.cineca.it/LAB/MAP/speech.html>
18. CAMAGGI CM, STROCCHI E, GIOVANNINI M, et al (1983) Medroxyprogesterone acetate (MPA) plasma levels after multiple high dose administration in advanced cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 11: 19-22.

19. CHAO HS, MYERS SE & HANDWERGER S (1993) Endothelin inhibits basal and stimulated release of prolactin by human decidual cells. *Endocrinology* 133: 505-510.
20. CHEGINI N, ROSSI MJ & MASTERSON BJ (1992) Platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), and EGF and PDGF b-receptors in human endometrial tissue: localization and *in vitro* action. *Endocrinology* 130: 2373-2385.
21. CHEGINI N, ZHAO Y, WILLIAMS RS & FLANDERS KC (1994) Human uterine tissue throughout the menstrual cycle expresses transforming growth factor-b1 (TGFb1), TGFb2, TGFb3, and TGFb type II receptor messenger ribonucleic acid and protein and contains [¹²⁵I]TGFb1-binding sites. *Endocrinology* 135: 439-449.
22. CHEUNG TH, LEUNG JO, CHUNG TK, LAM SK, TO KF & WONG YF (1997) c-fos overexpression is associated with the pathoneogenesis of invasive cervical cancer. *Gynecol Obstet Invest* 43: 200-203.
23. CHIAPPETTA C, KIRKLAND JL, LOOSE-MITCHELL DS, MURTHY L & STANCEL GM (1992) Estrogen regulates expression of the *jun* family of protooncogenes in the uterus. *J Steroid Biochem Molec Biol* 41: 113-123.
24. CHOMCZYNSKI P & SACCHI N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
25. CLARK BF (1971) The effect of oestrogen and progesterone on uterine cell division and epithelial morphology in spayed, adrenalectomized rats. *J Endocrinol* 50: 527-528.
26. CLARKE CL & SUTHERLAND RL (1990) Progestin regulation of cellular proliferation. *Endocrine Rev* 11: 266-301.
27. COHEN S (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237: 1555-1562.
28. DALY DC, MASLAR IA & RIDDICK DH (1983) Prolactin production during *in vitro* decidualization of proliferative endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 145: 672-678.
29. DE-MARTIN R, HAENDLER B, HOFER-WARBNEK R, et al (1987) Complementary DNA for human glioblastoma derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-b gene family. *EMBO J* 6: 3673-3677.
30. DERYNCK R, JARRETT JA, CHEN EY, et al (1985) Human transforming growth factor-b complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316: 701-705.
31. DERYNCK R, LINDQUIST PB, LEE A, et al (1988) A new type of transforming growth factor-b, TGF-b3. *EMBO J* 7: 3737-3743.
32. DI BLASIO AM, GIRALDI FP, VIGANO P, PETRAGLIA F, VIGNALDI M & CAVAGNINI F (1997) Expression of corticotropin-releasing hormone and its R1 receptor in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1594-1597.
33. DIMATTIA GE, GELLERSEN B, DUCKWORTH ML & FRIESEN HG (1990) Human prolactin gene expression. The use of an alternative noncoding exon in decidua and the IM-9-P3 lymphoblast cell line. *J Biol Chem* 265: 16412-16421.
34. DUBOIS DH, SIMMEN RCM, FLISS A, SMITH LC & BAZER FW (1993) Expression of c-fos in porcine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 49: 943-950.
35. ELLIGET KA, PHELPS PC & SMITH MW (1996) Transforming growth factor beta modulation of the epidermal growth factor Ca²⁺ signal and c-Fos oncoprotein levels in A431 human epidermoid carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 7: 461-468.
36. EVANS JJ, SIN IL & WHITE FJ (1982) Progesterone-binding globulin and progesterone in guinea-pigs after ovariectomy, abortion and parturition. *J Steroid Biochem* 16: 171-173.
37. FAZLEABAS AT, HILD-PETTITO S & VERHAGE HG (1995) The primate endometrium: morphological and secretory changes during early pregnancy -implications of the insulin-like growth factor axis. *Sem Reprod Endocrinol* 13: 120-132.
38. FERENCZY A, BERTRAND G & GELFAND MM (1979) Proliferation kinetics of human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 133: 859-867.

39. FERENCZY A, RICHART RM, AGATE FJ, PURKERSON ML & DEMPSEY EW (1972) Scanning electron microscopy of the human endometrial surface epithelium. *Fertil Steril* 23: 515-521.
40. FERRIANI RA, AHMED A, SHARKEY A & SMITH SK (1994) Colocalization of acidic and basic fibroblast growth factor (FGF) in human placenta and the cellular effects of bFGF in trophoblast cell line JEG-3. *Growth Factors* 10: 259-268.
41. FERRIANI RA, CHARNOCK-JONES DS, PRENTICE A, THOMAS EJ & SMITH SK (1993) Immunohistochemical localization of acidic and basic fibroblast growth factors in normal human endometrium and endometriosis and the detection of their mRNA by polymerase chain reaction. *Biol Reprod* 8: 11-16.
42. FERRIANI RA & SILVA-DE-SÁ MF (1988) Prolactin levels in blood from intervillous space of the human placenta. *Gynecol Obstet Invest* 26: 73-76.
43. FRANK GR, BRAR AK, CEDARS MI & HANDWERGER S (1994) Prostaglandin E₂ enhances human endometrial stromal cell differentiation. *Endocrinology* 134: 258-263.
44. FROST RA, MAZELLA J & TSENG L (1993) Insulin-like growth factor binding protein-1 inhibits the mitogenic effect of insulin-like growth factors and progestins in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 49: 104-111.
45. FUJIMOTO J, HORI M, ICHIGO S, MORISHITA S & TAMAYA T (1995) Clinical implication of fos and jun expressions and protein kinase activity in endometrial cancers. *Eur J Gynaecol Oncol* 16: 138-146.
46. FUJIMOTO J, HORI M, ICHIGO S, MORISHITA S & TAMAYA T (1996) Estrogen induces expression of c-fos and c-jun via activation of protein kinase C in an endometrial cancer cell line and fibroblasts derived from human uterine endometrium. *Gynecol Endocrinol* 10: 109-118.
47. GARCIA E, BOUCHARD P, DE-BRUX J, et al (1988) Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating. *J Clin Endocrinol Metab* 67: 80-87.
48. GELLERSEN B, KEMPF R, TELGMANN R & DIMATTIA GE (1994) Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol Endocrinol* 8: 356-373.
49. GHAHARY A & MURPHY LJ (1989) Uterine insulin-like growth factor-I receptors: Regulation by estrogen and variation throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 125: 597-604.
50. GIUDICE LC (1994) Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: Their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil Steril* 61: 1-17.
51. GIUDICE LC, DSUPIN BA & IRWIN JC (1992) Steroid and peptide regulation of insulin-like growth factor-binding proteins secreted by human endometrial stromal cells is dependent on stromal differentiation. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 1235-1241.
52. GIUDICE LC, DSUPIN BA, JIN IH, VU TH & HOFFMAN AR (1993) Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding insulin-like growth factors and their receptors in human uterine endometrium and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 1115-1122.
53. GOLANDER A, BARRETT JM, HURLEY T, BARRY S & HANDWERGER S (1979) Failure of bromocriptine, dopamine, and thyrotropin-releasing hormone to affect prolactin secretion by human decidual tissue *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 49: 787-789.
54. GOLD LI, SAXENA B, MITTAL KR, et al (1994) Increased expression of transforming growth factor b isoforms and basic fibroblast growth factor in complex hyperplasia and adenocarcinoma of the endometrium: Evidence for paracrine and autocrine action. *Cancer Res* 54: 2347-2358.
55. GOLDFIEN A & MONROE SE (1997) Ovaries. In: GREENSPAN FS and STREWLER GJ.(eds) Basic & Clinical Endocrinology. 5th edition, Prentice-Hall International, London. pp. 434-486.

56. GRAHAM JD & CLARKE CL (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Rev* 18: 502-519.
57. GURPIDE E & MURPHY LJ (1994) Effects of hormones and growth factors on human endometrial cell proliferation. In: LOBO RA.(ed) *Treatment of the Postmenopausal Woman*. Raven Press, New York. pp. 363 -372.
58. GUSSOW D, REIN R, GINJAAR I, et al (1987) The human b₂-microglobulin gene: primary structure and definition of the transcriptional unit. *J Immunol* 139: 3132-3138.
59. HAINING REB, SCHOFIELD JP, JONES DSC, RAJPUT-WILLIAMS J & SMITH SK (1991) Identification of mRNA for epidermal growth factor and transforming growth factor- α present in low copy number in human endometrium and decidua using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Mol Endocrinol* 6: 207-214.
60. HAMMOND MG, OH ST, ANNERS J, SURREY ES & HALME J (1993) The effect of growth factors on the proliferation of human endometrial stromal cells in culture. *Am J Obstet Gynecol* 168: 1131-1138.
61. HEALY DL (1984) The clinical significance of endometrial prolactin. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 24: 111-116.
62. HENRIKSEN R, GOBL A, WILANDER E, OBERG K, MIYAZONO K & FUNA K (1995) Expression and prognostic significance of TGF- β isoforms, latent TGF- β 1 binding protein, TGF- β type I and type II receptors, and endoglin in normal ovary and ovarian neoplasms. *Lab Invest* 73: 213-220.
63. HENZL MR, SMITH RE, BOOST G & TYLER ET (1972) Lysosomal concept of menstrual bleeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 34: 860-875.
64. HERTIG AT, ROCK J & ADAMS J (1956) A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *Am J Anat* 98: 485-494.
65. HIRAOKA Y, TATSUMI K, SHIOZAWA M, et al (1991) A placenta-specific 5' non-coding exon of human prolactin. *Mol Cell Endocrinol* 75: 71-80.
66. HOFMANN GE, SCOTT RT, BERGH PA & DELIGDISCH L (1991) Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in human endometrium, decidua and placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 882-887.
67. HOROWITZ GM, SCOTT RT, DREWS MR, NAVOT D & HOFMANN GE (1993) Immunohistochemical localization of transforming growth factor- α in human endometrium, decidua, and trophoblast. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 786-792.
68. HSU SM, RAINE L & FANGER H (1981) A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 75: 734-738.
69. HSUEH AJ, PECK EJ & CLARK JH (1976) Control of uterine estrogen receptor levels by progesterone. *Endocrinology* 98: 438-444.
70. HUANG JR, TSENG L, BISCHOF P & JÄNNE OA (1987) Regulation of prolactin production by progestin, estrogen, and relaxin in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 121: 2011-2017.
71. HUNT JS, CHEN H, HU X & TABIBZADEH S (1992) Tumor necrosis factor- α mRNA and protein in human endometrium. *Hum Reprod* 47: 141-147.
72. IRUELA-ARISPE ML, PORTER P, BORNSTEIN P & SAGE EH (1996) Thrombospondin-1, an inhibitor of angiogenesis, is regulated by progesterone in the human endometrium. *J Clin Invest* 97: 403-412.
73. IRWIN JC, DE LAS FUENTES L, DSUPIN BA & GIUDICE LC (1993) Insulin-like growth factor regulation of human endometrial stromal cell function: coordinate effects on insulin-like growth factor binding protein-1, cell proliferation and prolactin secretion. *Regul Pept* 48: 165-177.
74. IRWIN JC, UTIAN WH & ECKERT RL (1991) Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 129: 2385-2392.

75. JIKIHARA H & HANDWERGER S (1994) Tumor necrosis factor- α inhibits the synthesis and release of human decidual prolactin. *Endocrinology* 134: 353-357.
76. JOHNSON JWC, TYSON JE, MITZNER W, et al (1985) Amniotic fluid prolactin and fetal lung maturation. *Am J Obstet Gynecol* 153: 372-380.
77. JOSHI SG (1983) A progestagen-associated protein of the human endometrium: Basic studies and potential clinical applications. *J Steroid Biochem* 19: 751-757.
78. KANZAKI H, HATAYAMA H, NARUKAWA S, KARIYA Y, FUJITA J & MORI T (1995) Hormonal regulation in the production of macrophage colony-stimulating factor and transforming growth factor-beta by human endometrial stromal cells in culture. *Horm Res* 44 Suppl 2: 30-35.
79. KARIYA M, KANZAKI H, TAKAKURA K, et al (1991) Interleukin-1 inhibits *in vitro* decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 1170-1174.
80. KASTNER P, KRUST A, TURCOTTE B, et al (1990) Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 9: 1603-1614.
81. KAUMA S, MATT D, STROM S, EIRMAN D & TUNER T (1990) Interleukin-1 beta, human leukocyte antigen HLA-DR alpha, and transforming growth factor-beta expression in endome. *Am J Obstet Gynecol* 163: 1430-1437.
82. KAUMA S & SHAPIRO SS (1986) Immunoperoxidase localization of prolactin in endometrium during normal menstrual, luteal phase defect, and corrected luteal phase defect cycles. *Fertil Steril* 46: 37-41.
83. KING RJB & WHITEHEAD MI (1986) Assessment of the potency of orally administered progestins in women. *Fertil Steril* 46: 1062-1066.
84. KIRKLAND JL, LAPOINT L, JUSTIN E & STANCEL GM (1979) Effect of estrogen on mitosis in individual cell types of the immature rat uterus. *Biol Reprod* 21: 269-272.
85. KIRKLAND JL, MUTHY L & STANCEL GM (1992) Progesterone inhibits the estrogen-induced expression of c-fos messenger ribonucleic acid in the uterus. *Endocrinology* 130: 3223-3230.
86. KNAUER E (1900) Die ovarientransplantation. *Arch Gynakol* 60: 322-376.
87. KOUTSKY J, RYBAK M, JIRASEK JE & HLADOVEC J (1969) The content of plasminogen activator in the endometrium, estimated by the fibrin-agar plate method. *Gynecol Invest* 167: 257-263.
88. KRAUS WL, WEIS KE & KATZENELLENBOGEN BS (1995) Inhibitory cross-talk between steroid hormone receptors: differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transcriptional activity by agonist- and antagonist-occupied progestin receptors. *Mol Cell Biol* 15: 1847-1857.
89. KUBOTA T, KAMADA S, TAGUCHI M, SAKAMOTO S & ASO T (1993) Protein kinase C activation and calcium mobilization decrease prolactin release from human decidual cells in early pregnancy. *J Endocrinol* 137: 335-340.
90. LEVIN JH, TONETTA SA & LOBO RA (1990) Comparison of norethindrone and medroxyprogesterone acetate with natural progesterone and estradiol in stimulating prolactin production from cultured endometrial stromal cells. *Am J Obstet Gynecol* 163: 1932-1938.
91. LONGACRE TA & BARTOW SA (1986) A correlative morphologic study of human breast and endometrium in the menstrual cycle. *Am J Surg Pathol* 10: 382-393.
92. LOOSE-MITCHELL DS, CHIAPPETTA C & STANCEL GM (1988) Estrogen regulation of c-fos messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol* 2: 946-951.
93. LUCKY AW (1995) Hormonal correlates of acne and hirsutism. *Am J Med* 98: 89S-94S.
94. MADISEN L, WEBB NR, ROSE TM, et al (1988) Transforming growth factor-b2: cDNA cloning and sequence analysis. *DNA* 7: 1-8.

95. MALET C, GOMPEL A, SPRITZER PM, et al (1988) Tamoxifen and hydroxytamoxifen isomers versus estradiol effects on normal human breast cells in culture. *Cancer Res* 48: 7193-7199.
96. MARKOFF E, BARRY S & HANDWERGER S (1982) Influence of osmolality and ionic environment on the secretion of prolactin by human decidua *in vitro*. *J Endocrinol* 92: 103-110.
97. MARSH JM, BUTCHER RW, SAVARD K & SUTHERLAND EW (1966) The stimulatory effect of luteinizing hormone on adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in corpus luteum slices. *J Biol Chem* 241: 5436-5440.
98. MARSHBURN PB, ARICI A & CASEY ML (1994) Expression of transforming growth factor-beta 1 messenger ribonucleic acid and the modulation of deoxyribonucleic acid synthesis by transforming growth factor-beta 1 in human endometrial cells. *Am J Obstet Gynecol* 170: 1152-1158.
99. MASLAR IA & RIDDICK DH (1979) Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 135: 751-754.
100. MILGROM E, ATGER M & BAULIEU E (1970) Progesterone binding plasma protein (PBP). *Nature* 228: 1205-1206.
101. MIYAZAWA K (1992) Role of epidermal growth factor in obstetrics and gynecology. *Obstet Gynecol* 79: 1032-1040.
102. MOL JA, VAN GARDEREN E, RUTTEMAN GR & RIJNBERK A (1996) New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *J Steroid Biochem Molec Biol* 57: 67-71.
103. MURPHY LJ & MURPHY LC (1994) Steroid hormone induction of growth factor and oncogene expression in the uterus. In: KHAN SA and STANCEL GM. (eds) Protooncogenes and growth factors in steroid hormone induced growth and differentiation. CRC Press, Boca Raton. pp.31-45.
104. MURPHY LJ, MURPHY LC & FRIESEN HG (1987) Estrogen induces insulin-like growth factor-I expression in the rat uterus. *Mol Endocrinol* 1: 445-450.
105. NARUKAWA S, KANZAKI H, INOUE T, et al (1994) Androgens induce prolactin production by human endometrial stromal cells *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 165-168.
106. NAVOT D, LAUFER N, KOPOLOVIC J, et al (1986) Artificially induced endometrial cycles and establishment of pregnancies in the absence of the ovaries. *N Engl J Med* 314: 806-811.
107. NEGAMI AI & TOMINAGA T (1991) Effects of prolactin on cultured human endometrial cells. *Horm Res* 35: 50-57.
108. NELSON KG, TAKAHASHI T, BOSSERT NL, WALMER DK & McLACHLAN JA (1991) Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 21-25.
109. NELSON KG, TAKAHASHI T, LEE DC, et al (1992) Transforming growth factor- α is a potential mediator of estrogen action in the mouse uterus. *Endocrinology* 131: 1657-1664.
110. NISOLLE M, CASANAS-ROUX F & DONNEZ J (1995) Coexpression of cytokeratin and vimentin in eutopic endometrium and endometriosis throughout the menstrual cycle: evaluation by a computerized method. *Fertil Steril* 64: 69-75.
111. NOWAK RA, REIN M, HEFFNER LJ, FRIEDMAN AJ & TASHJIAN AH (1993) Production of prolactin by smooth muscle cells cultured from human uterine fibroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 1308-1313.
112. NOYES RW, HERTIG AT & ROCK J (1950) Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1: 3-15.
113. ODOM LD, BARRETT JM, PANTAZIS CG, STODDARD LD & McDONOUGH PG (1989) Immunocytochemical study of ras and myc proto-oncogene polypeptide expression in the human menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 161: 1663-1668.

114. OLIVEIRA MC, SPRITZER PM, CORONEL AX, DAHLEM N, MORAES JT & BARBOSA-COUTINHO LM (1993) Progestin effects on prolactin secretion and on immunoreactive prolactin cells in estradiol-treated ovariectomized rats. *Horm Metab Res* 25: 600-602.
115. PAPA M, MEZZOGIORNO V, BRESCIANI F & WEISZ A (1991) Estrogen induces *c-fos* expression specifically in the luminal and glandular epithelia of adult rat uterus. *Biochem Biophys Res Commun* 175: 480-485.
116. PEKONEN F, NYMAN T, L-AHTEENM-AKI P, HAUKKAMAA M & RUTANEN EM (1992) Intrauterine progestin induces continuous insulin-like growth factor-binding protein-1 production in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 660-664.
117. PETRAGLIA F, BENEDETTO C, FLORIO P, et al (1995) Effect of corticotropin-releasing factor-binding protein on prostaglandin release from cultured maternal decidua and on contractile activity of human myometrium in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 3073-3076.
118. PETRAGLIA F, FLORIO P, NAPPI C & GENAZZANI AD (1996) Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocrine Rev* 17: 156-186.
119. PIHOKER C, FEENEY RJ, SU JL & HANDWERGER S (1991) Lipocortin-I inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells: Evidence for autocrine/paracrine regulation by lipocortin-I. *Endocrinology* 128: 1123-1128.
120. POCOCK SJ & SIMON R (1975) Sequential treatment assignment with balancing for prognostic factors in the controlled clinical trial. *Biometrics* 31: 103-115.
121. PRENTICE A, THOMAS EJ, WEDDELL A, MCGILL A, RANDALL BJ & HORNE CHW (1992) Epidermal growth factor receptor expression in normal endometrium and endometriosis: an immunohistochemical study. *Br J Obstet Gynaecol* 99: 395-398.
122. PRESS MF, UDOVE JA & GREENE GL (1988) Progesterone receptor distribution in the human endometrium. Analysis using monoclonal antibodies to the human progesterone receptor. *Am J Pathol* 131: 112-124.
123. PRESTA M (1988) Sex hormones modulate the synthesis of basic fibroblast growth factor in human endometrial adenocarcinoma cells: implications for the neovascularization of normal and neoplastic endometrium. *J Cell Physiol* 137: 593-597.
124. RANDOLPH JF, PEEGEL H, ANSBACHER R & MENON KMJ (1990) In vitro induction of prolactin production and aromatase activity by gonadal steroids exclusively in the stroma of separated proliferative human endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 162: 1109-1114.
125. RAPPOLEE DA, MARK D, BANDA MJ & WERB Z (1988) Developmental expression of PDGF, TGF- α , and TGF- β genes in preimplantation mouse embryos. *Science* 241: 708-712.
126. REYNOLDS RK, TALAVERA F, ROBERTS JA, HOPKINS MP & MENON KMJ (1990) Regulation of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I receptors by estradiol and progesterone in normal and neoplastic endometrial cell cultures. *Gynecol Oncol* 38: 396-406.
127. RIBEIRO MF, SPRITZER PM, BARBOSA-COUTINHO LM, et al (1997) Effects of bromocriptine on serum prolactin levels, pituitary weight and immunoreactive prolactin cells in estradiol-treated ovariectomized rats: an experimental model of estrogen-dependent hyperprolactinemia. *Braz J Med Biol Res* 30: 113-117.
128. RIDDICK DH & MASLAR IA (1981) The transport of prolactin by human fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 52: 220-224.
129. ROBERTS AB, ANZANO MA, LAMB LC, SMITH JM & SPORN MB (1981) New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 5339-5343.
130. ROSSI D, DEL-GIACCO L, DONEDA L, et al (1996) Expression pattern of *c-sis*, *c-fos* and *c-jun* in human placenta and embryofetal organs. *Gynecol Obstet Invest* 42: 1-7.
131. SAJI M, TAGA M & MINAGUCHI H (1990) Epidermal growth factor stimulate cell proliferation and inhibits prolactin secretion of the human decidual cells in culture. *Endocrinol Japon* 37: 177-182.

132. SAKAKIBARA H, TAGA M, SAJI M, KIDA H & MINAGUCHI H (1994) Gene expression of epidermal growth factor in human endometrium during decidualization. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 223-226.
133. SALMI A & RUTANEN EM (1996) C-fos and c-jun expression in human endometrium and myometrium. *Mol Cell Endocrinol* 117: 233-240.
134. SAMBROOK J, FRITSCH EF & MANIATIS T (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
135. SAYEGH R, AWWAD JT, MAXWELL C, LESSEY B & ISAACSON K (1995) α_2 -macroglobulin production by the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1021-1026.
136. SCHATZ F, PAPP C, AIGNER S, KRIKUN G, HAUSKNECHT V & LOCKWOOD CJ (1997) Biological mechanisms underlying the clinical effects of RU 486: modulation of cultured endometrial stromal cell stromelysin-1 and prolactin expression. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 188-193.
137. SCHMIDT-GOLLWITZER M, EILETZ J, GENZ T & POLLOW K (1979) Determination of estradiol, estrone, and progesterone in serum and myometrium: correlation with the content of sex steroid receptors and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 49: 370-376.
138. SIMON C, FRANCÉS A, PELLICER A & POLAN ML (1995) Cytokines in implantation. *Sem Reprod Endocrinol* 13: 142-151.
139. SOUDA Y, FUKUMA K, KAWANO T, TANAKA T, MATSUO I & MAEYAMA M (1985) Activities of glycogen synthetase and glycogen phosphorylase in the human endometrium: relative distribution in isolated glands and stroma. *Am J Obstet Gynecol* 153: 100-105.
140. SPRITZER PM, BARBOSA-COUTINHO LM, POY M, ORSI V, DAHLEM N & SILVA ISB (1995) Effects of norethisterone acetate and tamoxifen on serum prolactin levels, uterine growth and on the presence of uterine immunoreactive prolactin in estradiol-treated ovariectomized rats. *Braz J Med Biol Res* 28: 125-130.
141. SPRITZER PM, POY M, WILTGEN D & LHULLIER F (1998) Endocrine metabolic features in hirsute patients with PCOS or idiopathic hirsutism: the influence of obesity. *Proceedings of the Annual Meeting of The Endocrine Society*
142. SPRITZER PM, RIBEIRO MF, OLIVEIRA MC, et al (1996) Effects of tamoxifen of prolactin levels, pituitary immunoreactive prolactin cells and uterine growth in estradiol-treated ovariectomized rats. *Horm Metab Res* 28: 171-176.
143. STANCEL GM, BOETTGER-TONG H, HYDER SM, KIRKLAND JL & LOOSE-MITCHELL DS (1994) Uterine c-fos: a paradigm for control of gene expression during estrogen stimulated target tissue growth. In: KHAN SA and STANCEL GM.(eds) Protooncogenes and growth factors in steroid hormone induced growth and differentiation. CRC Press, Boca Raton. pp.87-104.
144. STOCKARD CM & PAPANICOLAOU GN (1917) The existence of a typical oestrous cycle in the guinea-pig with a study of its histological and physiological changes. *Am J Anat* 22: 225
145. STRAUSS JF & GURPIDE E (1991) The endometrium: regulation and dysfunction. In: YEN SSC and JAFFE RB.(eds) Reproductive Endocrinology. 3rd edition, W. B. Saunders, Philadelphia. pp.309-356.
146. SUHONEN S, HAUKKAMAA M, HOLMSTREM T, L-AHTEENM-AKI P & RUTANEN EM (1996) Endometrial response to hormone replacement therapy as assessed by expression of insulin-like growth factor-binding protein-1 in the endometrium. *Fertil Steril* 65: 776-782.
147. SUVANTO-LUUKKONEN E, SUNDSTREM H, PENTTINEN J, KAUPPILA A & RUTANEN EM (1995) Insulin-like growth factor-binding protein-1: a biochemical marker of endometrial response to progestin during hormone replacement therapy. *Maturitas* 22: 255-262.
148. TABANELLI S, TANG B & GURPIDE E (1992) In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 42: 337-344.

149. TABIBZADEH S (1991) Human endometrium: An active site of cytokine production and action. *Endocrine Rev* 12: 272-290.
150. TABIBZADEH S (1995) Cytokines and endometrial microenvironments. *Sem Reprod Endocrinol* 13: 133-141.
151. TADOKORO N, KOIBUCHI N, OHTAKE H, et al (1995) Expression of prolactin gene in human decidua during pregnancy studied by in situ hybridization histochemistry. *Endocr J* 42: 537-543.
152. TANAKA S, KOIBUCHI N, OHTAKE H, et al (1996) Regional comparison of prolactin gene expression in the human decidualized endometrium in early and term pregnancy. *Eur J Endocrinol* 135: 177-183.
153. TANG B, GULLER S & GURPIDE E (1993) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induces prolactin expression in stromal cells isolated from human proliferative endometrium. *Endocrinology* 133: 2197-2203.
154. TANG B, ZHAO Y, ROSSI MJ, ABU-RUSTUM RS, KSANDER GA & CHEGINI N (1994) Expression of transforming growth factor-beta (TGF beta) isoforms and TGF beta type II receptor messenger ribonucleic acid and protein, and the effect of TGF beta s on endometrial stromal cell growth and protein degradation in vitro. *Endocrinology* 135: 450-459.
155. TAPLIN M, BUBLEY GJ, SHUSTER TD, et al (1995) Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* 332: 1393-1398.
156. TEN-DIJKE P, HANSEN P, IWATA KK, PIELER C & FOULKES JG (1988) Identification of another member of the transforming growth factor type b gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4715-4719.
157. THRAILKILL KM, GOLANDER A, UNDERWOOD LE & HANDWERGER S (1988) Insulin-like growth factor-I stimulates the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *Endocrinology* 123: 2930-2934.
158. THRAILKILL KM, GOLANDER A, UNDERWOOD LE, RICHARDS RG & HANDWERGER S (1989) Insulin stimulates the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *Endocrinology* 124: 3010-3014.
159. TOMITA K, McCASHEN JA, FRIESEN HG & TYSON JE (1982) Quantitative comparison between biological and immunological activities of prolactin from human fetal and maternal sources. *J Clin Endocrinol Metab* 55: 269-271.
160. TRUONG AT, DUEZ C, BELAYEW A, et al (1984) Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J* 3: 429-437.
161. TSENG L, GAO JG, CHEN R, ZHU HH, MAZELLA J & POWELL DR (1992) Effect of progestin, antiprogestin, and relaxin on the accumulation of prolactin and insulin-like growth factor-binding protein-1 messenger ribonucleic acid in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 47: 441-450.
162. TSENG L & GURPIDE E (1975) Effects of progestins on estradiol receptor levels in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 41: 402-404.
163. TYSON JE (1982) The evolutionary role of prolactin in mammalian osmoregulation: effects on fetoplacental hydromineral transport. *Sem Perinatol* 6: 216-228.
164. TYSON JE, HWANG P, GUYDA H & FRIESEN HG (1972) Studies of prolactin secretion in human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 113: 14-20.
165. VAN-STRAATEN F, MULLER R, CURRAN T, VAN-BEVEREN C & VERMA IM (1983) Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: Deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3183-3187.
166. WALKER RA & COWL J (1991) The expression of c-fos protein in human breast. *J Pathol* 163: 323-327.
167. WALSH SW (1989) 5-hydroxyeicosatetraenoic acid, leukotriene C4, and prostaglandin F2 alpha in amniotic fluid before and during term and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 161: 1352-1360.

168. WANG JD, ZHU JB, SHI WL & ZHU PD (1994) Immunocytochemical colocalization of progesterone receptor and prolactin in individual stromal cells of human decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 293-297.
169. WEISZ A & ROSALES R (1990) Identification of an estrogen response element upstream of the human *c-fos* gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res* 18: 5097-5106.
170. WHITEHEAD MI, TOWNSEND PT, PRYSE-DAVIES J, RYDER TA & KING RJB (1981) Effects of estrogens and progestins on the biochemistry and morphology of the postmenopausal endometrium. *N Engl J Med* 305: 1599-1605.
171. WU JX, CARPENTER PM, GRESENS C, et al (1990) The proto-oncogene *c-fos* is over-expressed in the majority of human osteosarcomas. *Oncogene* 5: 989-1000.
172. WU WX, BROOKS J, GLASIER AF & McNEILLY AS (1995) The relationship between decidualization and prolactin mRNA and production at different stages of human pregnancy. *J Mol Endocrinol* 14: 255-261.
173. WU WX, BROOKS J, MILLAR MR, et al (1991) Localization of the sites of synthesis and action of prolactin by immunocytochemistry and in-situ hybridization within the human utero-placental unit. *J Mol Endocrinol* 7: 241-247.
174. YEH J, OSATHANONDH R & VILLA-KOMAROFF L (1993) Expression of messenger ribonucleic acid for epidermal growth factor receptor and its ligands, epidermal growth factor and transforming growth factor- α , in human first- and second-trimester fetal ovary and uterus. *Am J Obstet Gynecol* 168: 1569-1573.
175. YEH J, REIN M & NOWAK RA (1991) Presence of messenger riconicleic acid for epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor demonstrable in monolayer cell cultures of myometria and leiomyomata. *Fertil Steril* 56: 997-1000.
176. ZHOU JP, DSUPIN BA, GIUDICE LC & Bondy CA (1994) Insulin-like growth factor system gene expression in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 1723-1734.
177. ZHU HH, HUANG JR, MAZELLA J & ROSENBERG M (1990) Differential effects of progestin and relaxin on the synthesis and secretion of immunoreactive prolactin in long term culture of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 889-899.

Anexos

1. Protocolo de registro das informações clínicas
 2. Termo de consentimento pós-informação
 3. Tabela de randomização
-

PROJETO DE PESQUISA - PROGESTERONA E DECIDUALIZAÇÃO DO ENDOMÉTRIO HUMANO

PROTOCOLO nº _____ ENVELOPE nº _____

ESTRATO: ☐ FF ☐ FL RANDOMIZAÇÃO: ☐ PLACEBO ☐ MPA

DIA PROVÁVEL DA CIRURGIA (CICLO) _____

DIA EM QUE FOI REALIZADA A CIRURGIA (CICLO) _____ DATA ____/____/19____

NOME: _____

Registro Hospitalar _____ ☐ HEMIPV ☐ HCPA ☐ _____

IDADE _____ anos MENARCA _____ anos G____P____A____

DATA DE INÍCIO DAS TRÊS ÚLTIMAS MENSTRUações:

____/____/19____ ____/____/19____ ____/____/19____

JÁ USOU CONTRACEPTIVO ORAL? ☐ SIM de ____/19____ a ____/19____

☐ NÃO

USA D.I.U.? ☐ SIM ☐ NÃO

USOU NOS ÚLTIMOS 3 MESES:

☐ ESTROGÊNIOS CONJUGADOS ☐ ESTRADIOL ☐ OUTRO ESTROGÊNIO

☐ MPA ☐ OUTRO PROGESTOGENIO ☐ ASSOCIAÇÕES HORMONAIAS

☐ HORMÔNIOS TIREOIDIANOS ☐ CORTICOSTERÓIDES ☐ INSULINA

☐ ANTIDEPRESSIVO TRICÍCLICO ☐ D.I.U. COM PROGESTOGENIO

USOU NOS ÚLTIMOS 6 MESES:

☐ DEPO-PROVERA® ☐ PERLUTAN® ☐ NORPLANT®

JÁ FEZ BIÓPSIA DE ENDOMÉTRIO?

☐ SIM ☐ NÃO

☐ NORMAL ☐ HIPERPLASIA SEM ATIPIAS

DATA ____/____/19____

☐ HIPERPLASIA ATÍPICA ☐ NEOPLASIA

ECOGRAFIA PÉLVICA? ☐ SIM ☐ NÃO SONDA VAGINAL? ☐ SIM ☐ NÃO

DATA ____/____/19____ ESPESSURA ENDOMETRIAL _____ mm

TABAGISTA? ☐ SIM ☐ NÃO _____ CIGARROS POR DIA HÁ _____ ANOS

MEDICAMENTOS DE USO CONTÍNUO:

PESO: _____ kg ESTATURA: _____ cm IMC: _____ kg/m²

Técnica de Biópsia: _____

Termo de Consentimento Informado
PROJETO DE PESQUISA - PROGESTERONA E DECIDUALIZAÇÃO DO ENDOMÉTRIO HUMANO

CONVITE PARA PARTICIPAR DO ESTUDO

Este ambulatório se dedica não só a oferecer assistência médica às pessoas que o procuram, mas também a pesquisar novos tratamentos para as doenças ginecológicas e a investigar as causas e os meios de prevenir essas doenças. Gostaríamos de convidá-la a colaborar conosco, participando de um desses estudos. Para sua tranquilidade, pedimos que leia com atenção e assine, se estiver de acordo, o consentimento abaixo:

Eu concordo em participar deste projeto de pesquisa, após ter sido esclarecida de que: (1) farei uso dos 10 comprimidos que me foram oferecidos, tomando 1 comprimido à noite, ao deitar, durante 10 dias; (2) os comprimidos poderão conter 10 mg de acetato de medroxiprogesterona – um medicamento conhecido e seguro –, ou não conter nenhum medicamento (placebo); (3) uma amostra do tecido que reveste internamente o meu útero (endométrio) será colhida no consultório; (4) após a coleta do material, uma parte dele será levada para exames laboratoriais com finalidade de pesquisa; o restante irá para os exames histopatológicos de rotina; (5) uma amostra do meu sangue (cerca de 10 ml) será retirada e guardada para futuros exames, para efeito de pesquisa; (6) os resultados de todos os exames feitos em função da pesquisa ser-me-ão comunicados sempre que eu os solicitar; (7) meu nome será mantido em sigilo absoluto em todas as fases da pesquisa; (8) qualquer dúvida que eu tiver será prontamente esclarecida pelos meus médicos; (9) se eu decidir abandonar a pesquisa, poderei fazê-lo a qualquer momento, sem nenhum prejuízo para o meu atendimento médico.

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/19____

Ass. do médico: _____

RANDOMIZAÇÃO

ESTRATO FF (BIÓPSIA NOS 10 PRIMEIROS DIAS DO CICLO)

BLOCOS DE 4: A=PPPM B=PPMP C=PMPP D=MPPP

ESTRATO FL (BIÓPSIA NOS 10 ÚLTIMOS DIAS DO CICLO)

BLOCOS DE 3: A=PPM B=PMP C=MPP

TABELA DE NÚMEROS ALEATÓRIOS (PRIMEIRA COLUNA, DESCENDENTE, DOIS ÚLTIMOS ALGARISMOS)

01 a 25 = A

26 a 50 = B

51 a 75 = C

76 a 00 = D (ou desconsiderar o número quando não há D)



RESULTADOS

FASE FOLICULAR

1. BLOCOS: B A A A

2. TRATAMENTOS:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
P	P	M	P	P	P	P	M	P	P	P	M	P	P	P	M

FASE LÚTEA

1. BLOCOS: B A B B B B B C C A

2. TRATAMENTOS:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
P	M	P	P	P	M	P	M	P	P	M	P	P	M	P

16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
P	M	P	P	M	P	M	P	P	M	P	P	P	P	M